

Aus der  
Klinik für Kleintiere  
der Veterinärmedizinischen Fakultät  
der Universität Leipzig

**Die Evaluierung der zytologischen Untersuchung  
endoskopisch gewonnener  
Darmbiopsien beim gesunden Hund**

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Grades eines  
Doctor medicinae veterinariae (Dr. med. vet.)  
durch die Veterinärmedizinische Fakultät  
der Universität Leipzig

eingereicht von  
Stella Fuchs  
aus Wuppertal

Leipzig, 2007

Mit Genehmigung der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Dekan: Prof. Dr. Karsten Fehlhaber

Betreuer: Prof. Dr. Gerhard Oechtering

Gutachter: Prof. Dr. Gerhard Oechtering, Klinik für Kleintiere,  
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Heinz-Adolf Schoon, Institut für Veterinär-Pathologie  
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Leipzig

Prof. Dr. Andreas Moritz, Klinik für Kleintiere  
Veterinärmedizinische Fakultät der Universität Giessen

Tag der Verteidigung: 04. September 2007

## Meinen Eltern



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Verzeichnis der Abkürzungen .....</b>	<b>III</b>
<b>1      Einleitung und Zielstellung .....</b>	<b>1</b>
<b>2      Literaturübersicht .....</b>	<b>3</b>
2.1    Endoskopie .....	3
2.1.1    Grundlagen .....	3
2.1.2    Gastroduodenoskopie .....	3
2.2    Allgemeine Zytopathologie .....	8
2.2.1    Gegenüberstellung von Zytologie und Histologie .....	8
2.2.2    Materialgewinnung für die zytologische Untersuchung .....	10
2.2.3    Fixierung und Färbung zytologischer Präparate.....	13
2.3    Allgemeine zytopathologische Tumordiagnostik .....	15
2.3.1    Auswertung der Präparate .....	15
2.3.2    Malignitätskriterien .....	16
2.3.3    Merkmale epithelialer Tumoren.....	19
2.3.4    Merkmale mesenchymaler Tumoren.....	19
2.3.5    Merkmale der Rundzelltumoren .....	20
2.4    Zytopathologische Diagnostik von Entzündungen.....	20
2.4.1    Akute Entzündung.....	21
2.4.2    Subakute Entzündung.....	21
2.4.3    Chronische Entzündung.....	21
2.4.4    Entzündungszellen.....	21
2.5    Die Histologie des Dünndarms.....	24
2.6    Die Zytologie des Darmkanals .....	25
2.7    Das gastrointestinale Immunsystem .....	27
2.7.1    Einfluss des Alters auf das Immunsystem.....	31
2.7.2    Einfluss der Fütterung auf das Immunsystem .....	32
2.7.3    Einfluss der gastrointestinalen Mikroflora auf das Immunsystem.....	33
2.7.4    Einfluss von Parasiten auf das gastrointestinale Immunsystem.....	33
2.8    Chronische Erkrankungen des Darmkanals beim Hund.....	34
2.8.1    „Inflammatory Bowel Disease“ .....	34
2.8.2    Bakterielle Überbesiedelung des Darmes .....	36
2.8.3    Futtermittel-Hypersensitivität.....	36
2.8.4    Neoplasien des Darmes.....	37
<b>3      Tiere, Material Und Methoden .....</b>	<b>39</b>
3.1    Untersuchte Tiere.....	39
3.2    Einschluss- und Ausschlusskriterien .....	39
3.3    Probengewinnung .....	40
3.4    Methoden .....	41
3.4.1    Allgemeine Qualitätsmerkmale.....	42
3.4.2    Zählung und Verteilung der Zellpopulationen.....	44
3.4.3    Zytologische Zellkriterien.....	44
3.5    Biostatistische Methoden .....	46

<b>4</b>	<b>Ergebnisse</b> .....	47
4.1	Endoskopische Befunde von Ösophagus, Magen und Duodenum .....	47
4.2	Allgemeine Kriterien .....	47
4.2.1	Qualität der Präparate .....	47
4.2.2	„Monolayer“ .....	48
4.2.3	Freies Kernprotein.....	48
4.2.4	Zellularität.....	48
4.2.5	Blutkontamination.....	48
4.2.6	Bakterien .....	48
4.2.7	Parasiten .....	49
4.2.8	Debris und Ingesta .....	49
4.2.9	Plattenepithelien.....	49
4.3	Zählung und Verteilung der einzelnen Zellpopulationen .....	49
4.4	Anordnung der Entzündungszellen .....	53
4.5	Zytologische Zellkriterien der Enterozyten .....	53
4.6	Referenzbereiche.....	54
4.7	Altersgruppenvergleich .....	56
4.7.1	Große helle Lymphozyten .....	57
4.7.2	Große granulierte Lymphozyten.....	58
4.7.3	Differenzialblutbild.....	60
<b>5</b>	<b>Diskussion</b> .....	61
5.1	Diskussion der Methode.....	61
5.2	Diskussion der Ergebnisse.....	64
5.2.1	Allgemeine Kriterien .....	64
5.2.2	Zellpopulationen und deren Anordnung .....	64
5.2.3	Zytologische Zellkriterien.....	71
5.2.4	Malignitätskriterien .....	73
5.2.5	Referenzbereiche.....	74
5.3	Altersunterschiede .....	76
5.4	Schlussfolgerungen.....	77
<b>6</b>	<b>Zusammenfassung</b> .....	80
<b>7</b>	<b>Summary</b> .....	82
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	84
<b>Anhang</b>	.....	95

## VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

ANOVA	Analysis of Variance
APUD	Amine and Precursors Uptake and Decarboxylation
CCD	Charge Coupled Device
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay
FR	Futtermittelunverträglichkeit
G	Gauge
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
HE	Hämatoxylin-Eosin
IBD	Inflammatory Bowel Disease
IEL	Intraepitheliale Leukozyten
Ig	Immunglobulin
LPE	Lymphoplasmazelluläre Enteritis
SIBO	Small Intestinal Bacterial Overgrowth





# 1 EINLEITUNG UND ZIELSTELLUNG

Die Diagnostik von chronischen Magen-Darm-Erkrankungen beim Hund stellt eine große Herausforderung dar. Eine ausführliche Anamnese ist sehr wichtig, um Anhaltspunkte über die Ätiologie und Pathogenese einer Erkrankung zu erhalten. Häufig ergeben die klinische Untersuchung, Blut- und Kotuntersuchungen keine spezifischen Diagnosekriterien für die enterale Krankheit. Röntgen- und Ultraschalluntersuchungen sind wichtige diagnostische Hilfsmittel, können aber zumeist ebenfalls zu wenig spezifische Informationen über Veränderungen der gastrointestinalen Mukosa liefern. Die endoskopische Untersuchung hingegen erlaubt eine direkte Beurteilung der Schleimhaut (GUILFORD 1990). Mit der Beschreibung von morphologischen Veränderungen der Mukosa ist meist aber noch keine exakte Diagnosestellung möglich, weshalb die Entnahme von Biopsien und deren histologische bzw. zytologische Untersuchung notwendig sind (HAPPE 1985).

Die histologische Untersuchung der Biopsien gilt als der Goldstandard bei der Beurteilung von Darmerkrankungen. Hierbei vergeht aber für den praktischen Tierarzt häufig wichtige Zeit, bevor die Diagnose vorliegt und die Behandlung beginnen kann. Ein schnellerer Weg ist die Zytologie, das heißt die Untersuchung von nur einzelnen, aus dem Gewebeverband heraus gelösten Zellen. Mit dieser Methode gelingt es möglicherweise besser zelluläre Veränderungen, wie die prozentuale Verteilung von Entzündungszellpopulationen objektiv zu erfassen. In einer ersten Studie bei Hunden bewerteten JERGENS et al. (1998) zytologische Präparate, die mit der Bürsten- und Abklatschmethode hergestellt wurden. Diese Ergebnisse zeigen eine viel versprechende Übereinstimmung mit der parallel durchgeführten Histologie.

Ein Problem bei der gastrointestinalen Zytologie wie auch der Histologie stellt die Definition bzw. Graduierung der pathologischen Befunde dar. Bis heute gibt es keine genauere Evaluierung der zytologischen Diagnostik des Magen-Darm-Kanals beim Kleintier. Häufig werden humanmedizinische zytologische beziehungsweise histopathologische Kriterien herangezogen. Die Diagnose unterliegt in hohem Masse der subjektiven Einschätzung und der Erfahrung des Untersuchers.

Ziele der vorliegenden Arbeit waren daher:

1. Beschreibung des physiologischen Zellbildes von Abklatschpräparaten endoskopisch gewonnener Darmbioptate des gesunden Hundes
2. Quantifizierung der Zellpopulationen und Erstellung zytologischer Referenzbereiche
3. Beschreibung der Anordnung von Entzündungszellen im Verhältnis zum Darmepithel
4. Untersuchung des Alterseinflusses der Hunde auf die verschiedenen Entzündungszellpopulationen

## **2 LITERATURÜBERSICHT**

### **2.1 Endoskopie**

#### **2.1.1 Grundlagen**

Die endoskopische Untersuchung des Magen-Darm-Traktes bei Kleintieren erfolgt überwiegend mit flexiblen Optiken, deren Spitzen in vier Richtungen beweglich sind und die einen Außendurchmesser von mindestens 7 mm aufweisen. Man unterscheidet das Faserendoskop vom Videoendoskop. Die bild- und lichtleitenden Komponenten des flexiblen Faserendoskopes bestehen aus Bündeln optischer Glasfasern. An jedem Ende der Faserbündel ist ein Linsensystem lokalisiert, das entscheidend zur Bildqualität beiträgt. Gastrointestinale Faserendoskope bestehen aus dem Insertionstubus, dem Handstück und dem Lichtleitkabel, das die Verbindung zur Lichtquelle herstellt. Der Tubus enthält die lichtleitenden und bildgebenden Bündel und ein oder zwei Arbeitskanäle, durch die Biopsie- und Fremdkörperfazzangen, Zytologiebürsten, Absaugröhrchen oder Diathermieschlingen eingeführt werden können. Im Gegensatz zu den Faserendoskopen wird beim Videoendoskop das Bild von einem CCD-Chip (Charge Coupled Device-Chip) an der Endoskopspitze registriert, elektronisch umgewandelt und auf einen Monitor übertragen. Vorteile sind eine bessere Bildqualität und die Unabhängigkeit von Faserbrüchen (JONES u. GROSS 1990).

#### **2.1.2 Gastroduodenoskopie**

##### **2.1.2.1 Vorteile und Nachteile**

Die Gastroduodenoskopie ist eine ideale Ergänzung zu anderen bildgebenden Verfahren. Gerade für die Diagnostik von mukosalen Magen- und Darmerkrankungen oder für den Nachweis luminaler Massen ist die Endoskopie eine relativ wenig invasive Methode. Zusätzlich können Schleimhautbiopsien zur weiteren Untersuchung entnommen werden. Die endoskopische Biopsieentnahme benötigt eine kürzere Anästhesiedauer als die chirurgische Biopsie und die Häufigkeit der peri- bzw. postoperativen Komplikationen ist wesentlich geringer (HITT 1995).

Funktionelle Veränderungen, wie zum Beispiel Motilitätsstörungen, Hypersekretion, subzelluläre Defekte und morphologische Veränderungen in der Muskularis und Submukosa sind allerdings nicht nachweisbar (GUILFORD 1990). Von Nachteil ist

weiterhin, dass nur proximale Darmanteile mit dem Endoskop erreicht werden können (HITT 1995). Bei einigen Erkrankungen, wie zum Beispiel dem skirrhösen Karzinom, ist das Gewebe zu derb für die Biopsieentnahme (WILLARD et al. 2001). Um eine ausreichende Größe der Biopsien zu gewährleisten, wird ein Außendurchmesser des Endoskops von mindestens 9 mm mit einem Arbeitskanal von 2,8 mm empfohlen (WILLARD et al. 2001). Diese Größe ist allerdings bei Patienten mit einer Körpermasse von weniger als 7 kg schwer anzuwenden (WILLARD et al. 2001).

Bei der chirurgischen Biopsieentnahme können im Gegensatz dazu alle Anteile des Darmes in der gesamten Länge inspiziert und „Fullthickness“-Biopsien gewonnen werden, die alle Schichten der Darmwand enthalten (WILLARD et al. 2001).

#### **2.1.2.2 Indikationen und Kontraindikationen**

Indikationen für eine Gastroduodenoskopie sind Zeichen einer Magen-Darm-Erkrankung, die mit Salivation, Vomitus, Diarrhoe, Hämatemesis, Meläna oder Anorexie besonders bei chronischem Verlauf einhergehen können. Zum Ausschluss metabolischer Erkrankungen sollten eine ausführliche Anamnese, eine klinische Untersuchung, ein komplettes Blutbild, ein blutchemisches Profil, eine Urinanalyse, Kotuntersuchungen sowie abdominale Röntgenaufnahmen und sonographische Untersuchungen des Abdomens durchgeführt werden (TAMS 1990).

Die häufigste Kontraindikation ist ein erhöhtes Narkoserisiko bei Patienten mit schwerwiegenden Allgemeinerkrankungen. Komplikationen, die durch die Endoskopie selbst entstehen, wie eine Perforation der Darmwand sind selten (GUILFORD 1990). Bei Tieren mit einer erhöhten Blutungsneigung besteht die Gefahr größerer Blutverluste als Folge des iatrogenen Traumas bei der Biopsieentnahme (JOHNSON u. TWEDT 1977).

#### **2.1.2.3 Vorbereitung des Patienten**

Für eine gute Beurteilbarkeit der endoskopischen Untersuchung ist eine gute Patientenvorbereitung notwendig. Während einige Autoren einen Futterentzug von 36 Stunden vor der Gastroduodenoskopie empfehlen, beschränken sich andere auf eine Fastenzeit von 12 bis 24 Stunden (HAPPE u. VAN DER GAAG 1983; GUILFORD 1990; ROTH et al. 1990a; HITT 1995). Eine Anästhesie ist für alle

endoskopischen Eingriffe nötig. In Abhängigkeit von der Konstitution des Patienten sollte man sich für ein standardisiertes Anästhesieprotokoll entscheiden (JONES 1990). JOHNSON u. TWEDT (1977) nutzen üblicherweise eine Narkoseeinleitung mit Oxymorphon und Atropin intravenös und zur Erhaltung die Inhalation von Lachgas und Halothan. In neueren Studien wird belegt, dass vor allem Atropin, mit und ohne Kombination mit Morphinen und auch Metoclopramid die Passage durch den Pylorus durch eine Steigerung des Pylorustonius signifikant erschweren (TAMS 1990; MATZ et al. 1991; MONROE et al. 1992; DONALDSON et al. 1993).

#### **2.1.2.4 Durchführung der endoskopischen Untersuchung**

Der Patient wird in linker Seitenlage gelagert. Das ermöglicht, alle Regionen des Magens zu untersuchen und vereinfacht die Passage durch das Antrum und den Pylorus in das Duodenum (TAMS 1990). Die Gastroskopie schließt sich der Ösophagoskopie an. Die Gastroskopie sollte nach einem festen Schema erfolgen, damit alle Abteilungen des Magens untersucht werden (siehe Abb. 1 und 2). Durch die Kardialöffnung erreicht das Endoskop die Magenöhle. Beim Weiterschieben des Endoskopes entlang der großen Kurvatur gelangt man über das Antrum zum Pylorus. Die Endoskopspitze lässt sich meist problemlos in den Pylorus einführen. Wird das Gerät vor dem Antrum maximal abgewinkelt, kann über den retrograden Blick die Untersuchung von Kardial und Fundus erfolgen (siehe Abb. 1 und 2) (TAMS 1990).

Nach Passage des Pylorus schiebt man das Endoskop in das kraniale Duodenum und erreicht unmittelbar die kraniale Flexur. Die normale Duodenalschleimhaut hat eine leicht violette Färbung und ist von etwas körnigerer Oberflächentextur und lockerem Gewebezusammenhalt als die Schleimhaut des Magens. Submuköse Gefäße sind in der Regel nicht sichtbar. Bei sorgfältiger Untersuchung kann unter Umständen die Papilla duodeni erkannt werden (GUILFORD 1990). Aggregierte Lymphfollikel (Peyer'sche Plaques) sind auf der antimesenterialen Seite des Dünndarmes in der Schleimhaut verteilt und endoskopisch sichtbar (BARKER et al. 1993).

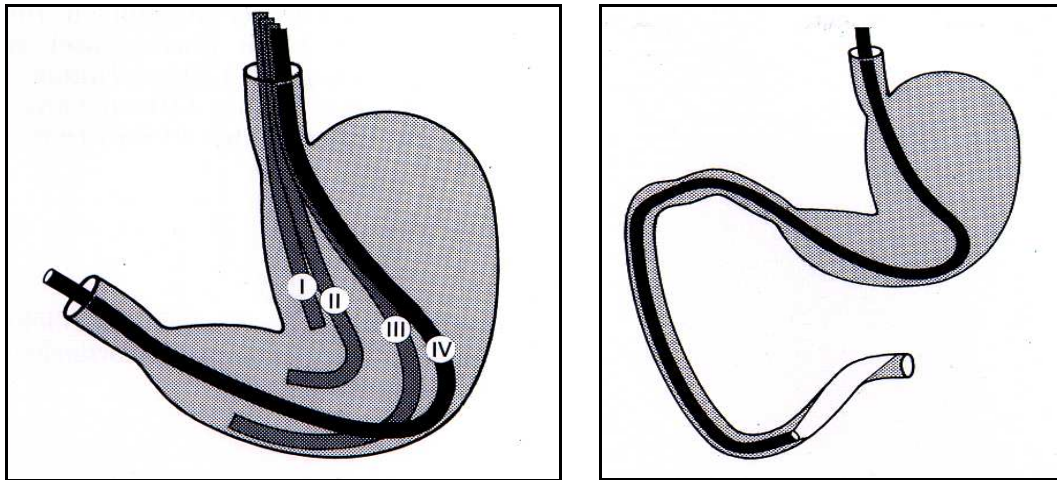


Abb. 1 und 2: Schematische Darstellung der verschiedenen Positionen der Magenpassage (I-IV) und Dünndarmpassage mit einem Gastroskop, Abbildung nach KRAFT (1993)

#### 2.1.2.5 Biopsietechnik

Eine Veränderung der Mukosaoberfläche kann auf eine infiltrative Erkrankung hinweisen. Oft sind allerdings keine Anzeichen einer Erkrankung sichtbar, darum sollten bei jeder endoskopischen Untersuchung Biopsien für pathohistologische Untersuchungen genommen werden (ROTH et al. 1990a; TAMS 1990;). Zur Biopsieentnahme werden scharfe Backenzangen mit einem innen liegenden Dorn genutzt, die mehrere Millimeter große Schleimhautstücke gezielt unter Sichtkontrolle aus der Mukosa beißen (siehe Abb. 3) (KRAFT 1993). WILLARD (2001) bevorzugt demgegenüber fenestrierte, ellipsoide Backenzangen mit gezackten Rändern und ohne Zentralsporn. Schleimhautbiopsien von guter Qualität erscheinen weißlich-opak und enthalten die gesamte Schicht der Schleimhaut bis zur Lamina muscularis mucosae (WILLARD 2001). Es sollten mindestens acht Biopsien aus dem Dünndarm entnommen werden. Nicht alle Veränderungen erstrecken sich über die gesamte Länge des Dünndarms (WILLARD et al. 2001). Das gewonnene Material kann für eine histologische oder zytologische Untersuchung herangezogen werden (JERGENS et al. 1997; JERGENS et al. 1998; JERGENS et al. 2000).

Eine nützliche Zusatzuntersuchung stellt die Bürstenzytologie dar. Mit der Bürstentechnik werden Zellen und Mikroorganismen von einer größeren Oberfläche gewonnen (WANG et al. 1991; HITT 1995; O'DONOGHUE et al. 1995; JERGENS et al. 1997; JERGENS et al. 2000). Diese Technik hat in der Humanmedizin die Diagnostik von gastrointestinalen Neoplasien um 10% verbessert (GUILFORD 1990).



Abb. 3: Schleimhautbiopsie mit einer Forcepszange unter Sichtkontrolle

#### **2.1.2.6 Sichtbare Veränderungen**

Die Beschreibung der Mukosa sollte den Grad der Rötung, den Gewebезusammenhalt, die Oberflächentextur, Erosionen und Ulzerationen, Mukus und Sichtbarkeit der submukösen Gefäße beinhalten (siehe Abb. 4 und 5) (GUILFORD 1990). Der Grad der Rötung wird durch Hyperämie bedingt. Hyperämie ist kein physiologischer Befund, aber meist nicht mit einer histologischen Veränderung assoziiert (ROTH et al. 1990a).

Veränderungen der Mukosatextur werden als verminderter Gewebезusammenhalt und vermehrte Oberflächenrauhigkeit, auch als „Cobble-stone“-Architektur bezeichnet, beschrieben. 82% der Biopsien von Patienten (Hunde und Katzen) mit dem endoskopischen Befund eines verminderten Gewebезusammenhaltes und vermehrter Oberflächenrauhigkeit waren histologisch mit einer vermehrten Zellularität verbunden, die die Dicke der Zotten und Krypten beeinflusst und die Oberfläche rauer erscheinen lässt (ROTH et al. 1990a). Ulzerationen und Erosionen werden häufig bei dem intestinale Lymphom oder Adenokarzinom beobachtet, können aber auch Folge von mechanischer Schädigung oder anderen Erkrankungen sein (GUILFORD 1990).

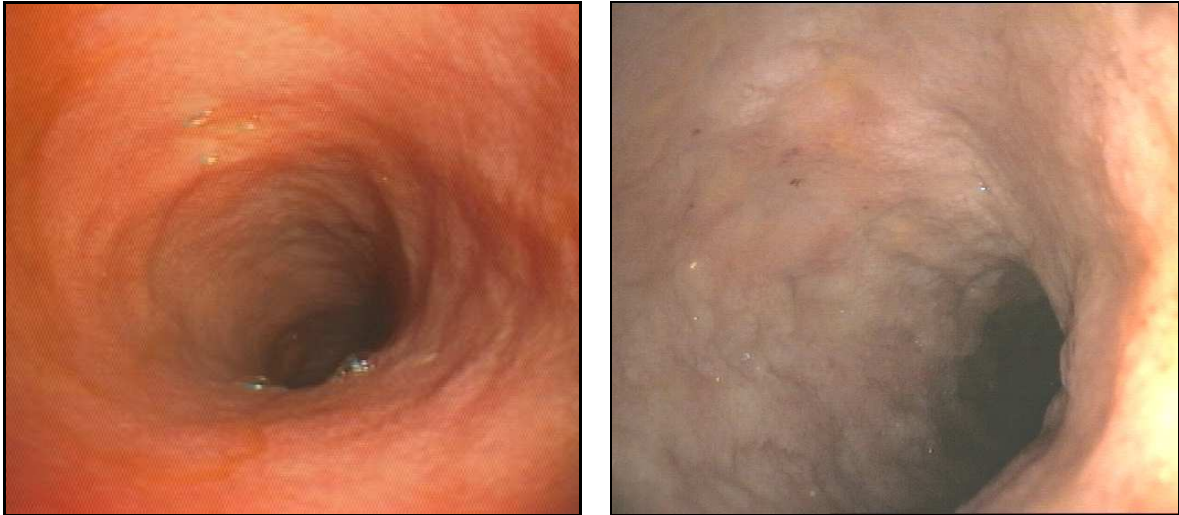


Abb. 4 und 5: Endoskopischer Blick auf die physiologische Darmschleimhaut (links) und auf Schleimhaut mit vermehrter Rauigkeit der Oberfläche, „Cobble Stone“-Architektur (rechts)

## **2.2 Allgemeine Zytopathologie**

### **2.2.1 Gegenüberstellung von Zytologie und Histologie**

#### **2.2.1.1 Unterschiede**

Während in histologischen Schnittpräparaten die Gewebe- bzw. Tumortextur meist vollständig erhalten bleibt, liegen in zytologischen Präparaten nur Einzelzellen bzw. kleinere Zellverbände vor. Die Beurteilung des angrenzenden Gewebes ist in der Zytodiagnostik nicht möglich. Auch sind die diagnostisch wichtigen Zellen, wie zum Beispiel Tumorzellen, gegenüber anderen Zellpopulationen gelegentlich im Hintergrund und müssen sorgfältig gesucht werden (STIRTZINGER 1988).

Sind Spezialuntersuchungen nötig, können von histopathologischen Proben beliebig viele Nachschnitte angefertigt werden. Dem Zytologen stehen im Gegensatz dazu nur die angefertigten Ausstriche zur Verfügung (UEBERSCHÄR 1996).

Unterschiede in der Morphologie machen einen direkten Vergleich beider Methoden für den ungeübten Betrachter schwierig. Kern- und Zytoplasmastrukturen sind in der Histopathologie scharf und prägnant dargestellt. Dagegen erscheinen die Kernstrukturen in zytologischen Präparaten meist plump und leicht unscharf. Die aus dem Gewebsverband heraus gelösten Zellen werden durch Kompression und Eintrocknung auf dem Objektträger extrem vergrößert (UEBERSCHÄR 1996).



### **2.2.1.2 Vorteile der zytopathologischen Diagnostik**

Für die zytologische Untersuchung können mit nur geringfügigen instrumentellen Voraussetzungen Präparate hergestellt und ausgewertet werden. Die Untersuchungsergebnisse können innerhalb weniger Minuten vorliegen und den weiteren Therapieplan mitbestimmen (BARTON 1987; CLINKENBEARD u. COWELL 1994). In der Regel ist die Materialgewinnung nur wenig invasiv.

Auch in der Gastroenterologie ist die Zytologie eine nützliche Zusatzuntersuchung zur histologischen Untersuchung von Biopsien. Erste Untersuchungen weisen auf eine hohe Korrelation mit histologischen Befunden hin. Klinische Vorteile schließen die Einfachheit der endoskopischen Probengewinnung, Schnelligkeit der Diagnose und minimale Invasivität mit ein (JERGENS et al. 1997; JERGENS et al. 1998; JERGENS et al. 2000). Mit der Bürstenmethode werden über ein größeres Areal oberflächliche Mukosazellen aufgenommen. Organismen, wie z.B. Protozoen, die im Mukus des Magen-Darm-Traktes leben, können in Bürstenzytologiepräparaten erkannt werden, häufig aber nicht in histologischen Biopsien (GUILFORD 1990; DEBONGNIE et al. 1994). Die Präparate sind allerdings in vielen Fällen zellarm. Die Zellen stammen nur von den oberflächlichen Bereichen und sind zum Teil beschädigt. Dem gegenüber enthalten Abklatschpräparate von Biopsien Zellen von der gesamten Schleimhautschicht bis zur Lamina muscularis mucosae (WILLARD et al. 2001). Die Infiltration der Schleimhaut mit Entzündungszellen kann in diesen Präparaten besser beurteilt werden.

### **2.2.1.3 Nachteile und Grenzen der Zytologie**

In zytologischen Präparaten liegen nur einzelne Zellen zur Untersuchung und Beurteilung vor. In der Regel ist es nur möglich, eine maligne Neoplasie von einem nicht tumorösen Prozess abzugrenzen. Unter Umständen gelingt die grobe Klassifikation eines Tumors (HALL u. MACWILLIAMS 1988). Eine Aussage über die Gewebearchitektur, über das Wachstumsverhalten und Invasivität in das angrenzende Gewebe ist nicht möglich (STIRTZINGER 1988). Entzündungsreaktionen können zytologisch überbewertet werden und zu einer falschen Diagnose verleiten (UEBERSCHÄR 1996).

## 2.2.2 Materialgewinnung für die zytologische Untersuchung

Zytologische Präparate können durch Tupf- und Schabetechniken sowie Feinnadelaspirationsbiopsie gewonnen werden (TYLER et al. 1989). Zur Sicherheit sollten immer mehrere Ausstriche angefertigt werden und einige ungefärbt bleiben, um als Reserve für eventuell später benötigte Spezialfärbungen zu dienen (TYLER et al. 1989).

### 2.2.2.1 Abklatschtechnik

Durch direkten Kontakt eines Objektträgers mit einer Gewebeoberfläche werden abschilfernde Zellen auf den Objektträger übertragen und so relativ zellreiche Abklatschpräparate hergestellt (siehe Abb. 6). Diese Methode eignet sich für Läsionen an der Körperoberfläche und Organbiopsien (REBAR 1980b; STIRTZINGER 1988; STOCKHAUS et al. 2004). Vor allem bei Läsionen an der Körperoberfläche weisen Abklatschpräparate häufig eine starke Kontamination mit Bakterien und Infiltration mit Entzündungszellen auf, was eine Interpretation der Befunde erschwert (TYLER et al. 1989).

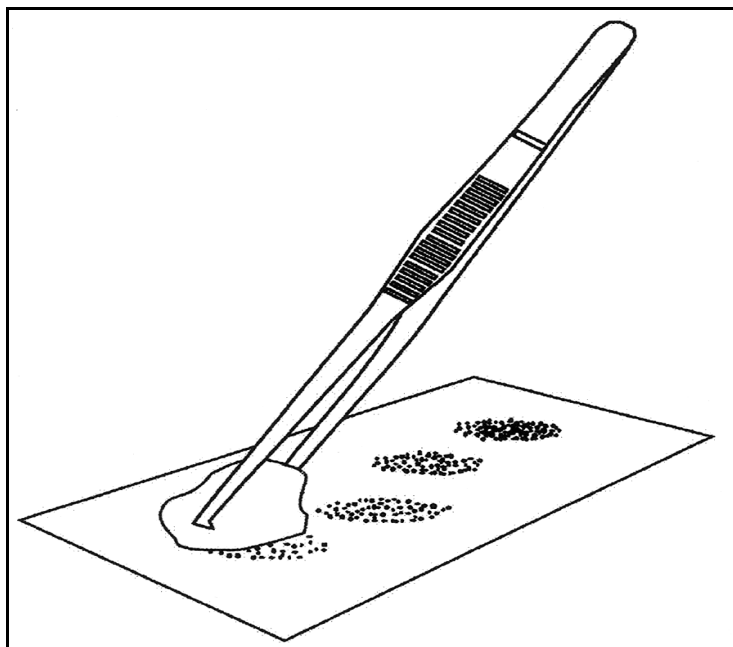


Abb. 6: Herstellung eines Abklatschpräparates, Abbildung nach O'ROURKE (1983)

#### **2.2.2.2 Schabetechnik**

Bei festen Umfangsvermehrungen, die sonst nur wenige Zellen abgeben, können mit der Schabetechnik zellreiche Präparate hergestellt werden. Nachteilig ist die stärkere Beschädigung der Zellen durch die Art der Materialgewinnung. Indikationen für die Anwendung der Schabetechnik sind zum einen sehr derbe Strukturen. Zum anderen wird sie als Ergänzung bei der Diagnostik von intranasalen Neoplasien (CLERCX et al. 1996) und eingeschränkt auch in der Diagnostik von Magen-Darm-Erkrankungen eingesetzt (WANG et al. 1991; O'DONOGHUE et al. 1995; JERGENS et al. 1998). Durch Schaben entlang der frischen Oberfläche mit Skalpell oder Bürste wird genug Probenmaterial gewonnen, um es auf mehrere Objektträger auszustreichen (DUNCAN u. PRASSE 1976).

Die Zytologiebürsten lassen sich auch über den Instrumentenkanal eines Endoskops einsetzen und finden deshalb bei der Probengewinnung aus Hohlorganen, wie zum Beispiel aus dem Magen-Darm-Kanal, Anwendung (WANG et al. 1991; O'DONOGHUE et al. 1995; JERGENS et al. 1998).

#### **2.2.2.3 Feinnadelaspirationsbiopsie**

Die bevorzugte Methode zur Materialgewinnung in der Zytologie stellt die Feinnadelaspirationsbiopsie dar. Für die Punktion einer subkutan gelegenen Umfangsvermehrung reicht es aus, die Stelle wie für eine Venenpunktion vorzubereiten. Für Punktionen in eine Körperhöhle sollte das Areal wie für einen chirurgischen Eingriff vorbereitet werden (CLINKENBEARD u. COWELL 1994). Die zu punktierende Umfangsvermehrung bzw. das Organ wird so nah wie möglich an der Körperoberfläche mit einer Hand fixiert, während man die Kanüle in das zu punktierende Gewebe einsticht (DUNCAN u. PRASSE 1976). Je weicher das punktierte Gewebe ist, desto kleiner können Kanüle und Spritze gewählt werden. Feinnadelbiopsien werden mit oder ohne Aspiration durchgeführt. Bei der Aspirationstechnik wird durch Rückziehen des Spritzenkolbens ein Unterdruck aufgebaut und exfoliierte Zellen in das Kanülenlumen eingezogen (DUNCAN u. PRASSE 1976). Wichtig ist, dass der Unterdruck aufgehoben wird, bevor die Kanüle aus dem Gewebe gezogen wird, da sonst das aspirierte Material in die Spritze gelangt und schwierig auf den Objektträger zu bringen ist (REBAR 1980a; REBAR 1980b). Bei der Technik ohne Aspiration wird kein Unterdruck erzeugt. Hier werden

die Zellen allein durch das Vorschieben in das Gewebe im Kanülenlumen gesammelt. Diese Technik eignet sich bei stark durchbluteten Organen (TYLER et al. 1989).

Nach dem Herausziehen der Kanüle wird diese von der Spritze entfernt, die Spritze mit Luft gefüllt, anschließend die Kanüle wieder aufgesetzt. Durch Entleerung der luftgefüllten Spritze wird nun das Material im Kanülenlumen auf einen Objektträger gedrückt (siehe Abb. 7) (REBAR 1980a). Für die weitere Bearbeitung zur Herstellung von Präparaten stehen unterschiedliche Techniken zur Verfügung.

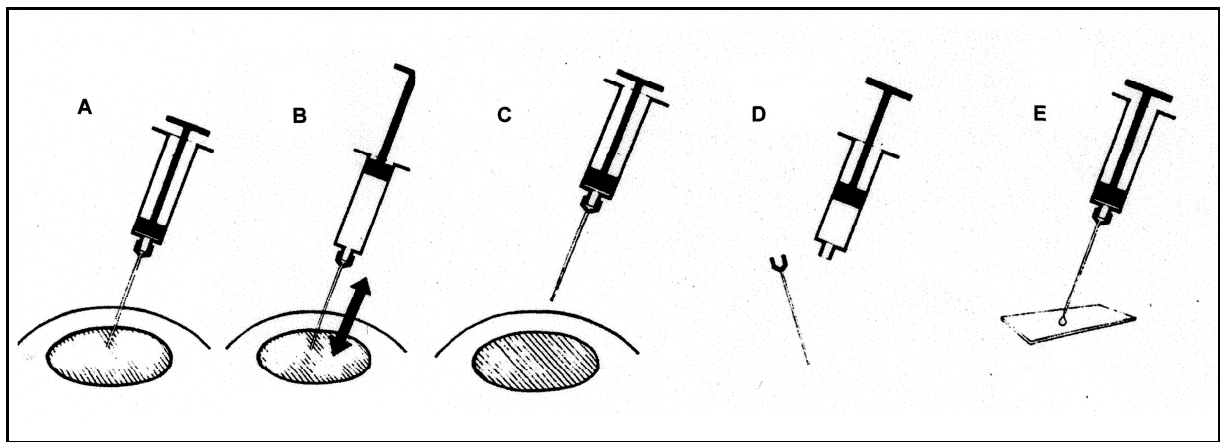


Abb. 7: Durchführung der Feinnadelaspirationsbiopsie, Abbildung nach ORELL (1999); A. Punktion der Umfangsvermehrung, B. Aspiration, C. Entfernen der Spritze, D. Absetzen der Kanüle und Füllung der Spritze mit Luft, E. durch Entleerung der luftgefüllten Spritze wird der Inhalt der Kanüle auf einen Objektträger aufgetragen

#### 2.2.2.3.1 Herstellung von Präparaten

Zur Vermeidung von Autolyse und Koagulation innerhalb der Kanüle sollte das Material unmittelbar nach Entnahme ausgestrichen werden. Für die optimale Beurteilung sollten die Zellen einschichtig als „Monolayer“ liegen, Zellkern und Zytoplasma sind so deutlich zu erkennen (CLINKENBEARD u. COWELL 1994). Je nach Viskosität des gewonnenen Materials und nach Vorliebe des Untersuchers wird die Methode des Ausstrichs gewählt.

#### 2.2.2.3.2 Quetsch-Technik

Das Aspirat wird in die Mitte eines Objektträgers platziert und ein zweiter Objektträger wird im rechten Winkel auf den ersten gelegt und schnell und zügig ohne Druck über den ersten Objektträger ausgestrichen (TYLER et al. 1989). Diese

Methode eignet sich besonders für Material mit hoher Viskosität oder gewebige Aspiarte, wie zum Beispiel Leberbiopsien (STOCKHAUS u. TESKE 1999).

#### **2.2.2.3.3 Nadelausstrich-Technik**

Insbesondere bei Punktaten mit nur sehr wenig Probenmaterial eignet sich diese zellschonende Methode. Das auf den Objektträger überführte Material wird mit der Spitze einer Kanüle sternförmig in verschiedene Richtungen ausgezogen. Die Beurteilung der Zelldetails wird allerdings manchmal dadurch erschwert, dass relativ viel Gewebsflüssigkeit die Zellen an ihrer Ausbreitung hindert (TYLER et al. 1989).

#### **2.2.2.3.4 Blutausstrich-Technik**

Flüssigkeitsreiche Punktate kann man gut mit dieser Methode ausstreichen. Ein Tropfen des Punktates wird am Ende eines Objektträgers platziert und ein zweiter Objektträger in einem Winkel von 45 Grad gegen die Ausstrichrichtung auf die Probe zu bewegt. Der Tropfen breitet sich entlang der Kante des Objektträgers aus. Mit einer zügigen und gleichmäßigen Vorwärtsbewegung wird die Probe nun über den Objektträger in Form einer Fahne ausgestrichen (PERMAN et al. 1979; TYLER et al. 1989).

### **2.2.3 Fixierung und Färbung zytologischer Präparate**

#### **2.2.3.1 Fixierung**

Zur Konservierung der Zellen im zytologischen Präparat müssen ablaufende Stoffwechselprozesse durch Fixation gestoppt werden. Zusätzlich wird verhindert, dass die Zellen beim folgenden Färbevorgang abgelöst werden (FASSKE 1964). Je nach Färbemethode besteht die Möglichkeit der Fixierung durch Trocknung oder mittels Alkohol bzw. Aceton. Beide Methoden basieren auf dem Prinzip der Proteindenaturierung durch Wasserentzug. Während die Zellen bei der Alkoholfixierung durch Koagulation der Proteine schrumpfen, erscheinen sie nach Lufttrocknung eher aufgetrieben; intranukleäre Strukturen sind so besser zu erkennen (FASSKE 1964; SOOST 1978).

### **2.2.3.2 Färbung**

Durch die Denaturierung bei der Fixation werden chemische Gruppen exponiert, die mit bestimmten Farbstoffen reagieren. Fixierte Gewebe oder Zellen werden färbbar (LEONHARDT 1990). In der Zytologie werden hauptsächlich zwei Haupttypen der Färbung angewendet: der Romanowsky-Typ und der Papanicolaou-Typ und deren Abkömmlinge.

#### **2.2.3.2.1 Färbung nach Papanicolaou**

Papanicolaou-Färbungen sind Kernfärbungen und eignen sich besonders für die Beurteilung von Neoplasien. Da das Zytoplasma nur schwach angefärbt wird, können sogar die Kerne von dicken, mehrschichtigen Ausstrichen beurteilt werden (REBAR et al. 1982). Zytoplasmatische Veränderungen, Bakterien und andere Organismen können nicht oder nur schlecht erkannt werden (TYLER et al. 1989).

Vor der Färbung mit Hämatoxylin und mehreren Spezialfärbungen müssen die Präparate mit Ethanol fixiert werden. Das macht diese Methode in der Durchführung etwas aufwendiger (SOOST 1978).

Die Trichrom Färbung ist eine Variante, bei der die Kontrastierung der Bindegewebe durch eine dritte Farbe erzeugt wird (BURCK 1973). Außerdem werden die Kerndetails noch besser als mit der einfachen Papanicolaou-Färbung wiedergegeben (BOON et al. 1982). Die alkoholfixierten Ausstriche werden mit Eisenhämatoxylin, Säurefuchsin, Phosphormolybdänsäure und Anilinblaulösung gefärbt und anschließend gründlich gespült (FASSKE 1964).

Für die Hämatoxylin-Eosin-Färbung werden alkoholfixierte Präparate über mehrere Stunden mit Hämatoxylin und Eosin gefärbt. Bei dieser Methode erscheinen Zellkerne je nach Chromatingehalt hell- bis tiefblau und das Zytoplasma rot (FASSKE 1964).

#### **2.2.3.2.2 Färbung nach Romanowsky**

Die Romanowsky-Färbungen sind preiswert, einfach und haltbar. Das Zytoplasma und Organismen werden hervorragend angefärbt, während das Kerndetail ausreicht, um eine Neoplasie zu erkennen (TYLER et al. 1989). Es gibt viele kommerziell

erhältliche Romanowsky-Färbungen, inklusive Diff-Quick®<sup>1</sup> und anderer Schnelfärbungen nach Wright. Allen gemeinsam ist die Fixation durch Lufttrocknung (REBAR 1980b; BOON et al. 1982; TYLER et al. 1989).

Die Färbung nach Pappenheim (May-Grünwald-Giemsa) ist eine hämatologische Färbung. Die luftgetrockneten Präparate werden drei Minuten in eine May-Grünwald-Lösung eingelegt und nach einem Spülvorgang 12-15 Minuten mit Giemsa-Lösung nachgefärbt (FASSKE 1964).

Bei der Schnelfärbung nach Diff-Quik® stehen die Präparate innerhalb weniger Minuten zur Verfügung. Es handelt sich um eine polychromatische Färbung. Die Zellstrukturen erscheinen undeutlicher als bei der Pappenheim-Färbung. Die Nucleoli können allerdings prominenter angefärbt werden, so dass eine falsch positive Tumordiagnose gestellt werden kann (STOCKHAUS u. WERNER 1996).

Die Methylenblau-Färbung eignet sich nicht zur Archivierung (HALL u. MACWILLIAMS 1988). Während Kern- und Kernkörperchendetails gut dargestellt werden, wird das Zytoplasma nur schwach angefärbt. Diese Färbung eignet sich vor allem zur Beurteilung der Zellkerne bei blutreichen und/oder zellreichen Präparaten, wo die Zellmorphologie durch Erythrozyten oder basophiles Zytoplasma bei Romanowsky-Färbung verdeckt werden würde (HALL u. MACWILLIAMS 1988; TYLER et al. 1989).

## **2.3 Allgemeine zytopathologische Tumordiagnostik**

### **2.3.1 Auswertung der Präparate**

Zur Beurteilung der Qualität werden zunächst alle Präparate bei schwacher Vergrößerung (100er Vergrößerung) grob durchgemustert (WELLMAN 1990). Einen Eindruck über die vorhandenen Zellpopulationen und -zusammensetzung erhält man mit der 200er Vergrößerung. Die Einzelzelle wird mit den nächst höheren Vergrößerungen (400er oder 640er Vergrößerung) untersucht. Gegebenenfalls kann man so die Kernkörperchen und die Chromatinstruktur erkennen. Eine wirkliche Beurteilung der zellulären Details erfolgt aber am besten mit der 1000er Vergrößerung (Ölimmersion) (TYLER et al. 1989).

---

<sup>1</sup> Diff Quick, Firma Dade Behring, Marburg

Zur Interpretation sollten nur intakte Zellen herangezogen werden; rupturierte Zellen mit vergrößertem Kern, blassem diffusen Chromatin und Prominenz der Kernkörperchen können sonst mit neoplastischen Zellen verwechselt werden (WELLMAN 1990).

### **2.3.2 Malignitätskriterien**

Neoplastische Prozesse können in benigne, semimaligne oder maligne unterschieden werden. Zytologisch ist es nicht möglich, zwischen gutartiger Neoplasie und Hyperplasie zu unterscheiden. Bösartige Prozesse werden anhand spezifischer zytologischer Malignitätskriterien identifiziert (siehe Abb. 8) (REBAR 1980a). Diese Kriterien resultieren aus einer asynchronen Entwicklung und Zellproliferation ohne normale Differenzierung der Zellen (CLINKENBEARD u. COWELL 1994). Lassen sich mehr als drei Malignitätskriterien an einem hohen Prozentsatz der Tumorzellen erkennen, kann von einem malignen Prozess ausgegangen werden (TYLER et al. 1989). STIRTZINGER (1988) teilt die Malignitätskriterien in drei Kategorien ein:

1) allgemeine Kriterien, 2) Kernkriterien und 3) zytoplasmatischen Kriterien, wobei den Kernkriterien die größte Wertigkeit zukommt.

#### **2.3.2.1 Allgemeine Kriterien**

Normales Gewebe besteht aus einer einheitlichen Population von Zellen gleicher Größe und Form (DE NICOLA u. REAGAN 1998). Ein ausgeprägter Zellpleomorphismus, d.h. Variation der Größe (Anisozytose) und Form der vorhandenen Zellpopulation, kennzeichnet häufig neoplastische Zellen (CLINKENBEARD u. COWELL 1994). Hierbei können einige Zellen die 1,5 fache Größe normaler Zellen aufweisen (Makrozytose) (TYLER et al. 1989). Hyperzellularität im zytologischen Präparat tritt dann auf, wenn durch die übermäßige Proliferation die neoplastischen Zellen ihre Adhärenz verlieren. Zytologische Präparate von Geweben, die normalerweise nur schlecht Zellen exfolieren, sind bei malignen Proliferationen auffallend zellreich (ZINKL 1981).



### **2.3.2.2 Kernkriterien**

Maligne Zellen sind oft durch eine erhöhte Kerngröße (Makrokaryose) gekennzeichnet. Insbesondere Kerne mit einem Durchmesser von mehr als 10 µm sind ein Zeichen von Malignität (CLINKENBEARD u. COWELL 1994). Die Makrokaryose resultiert aus einer Polyploidität der DNA ohne Kernteilung (BARTON 1987).

Abhängig vom Gewebetyp haben Zellen ein normales Kern-Zytoplasma-Verhältnis von 1:3 bis 1:8 (TYLER et al. 1989). Durch die relative Vergrößerung des Kerns im Vergleich zum Zytoplasma kommt es zu einer Verschiebung der Relation. Das Kern-Plasma-Verhältnis erreicht dabei Werte von 1:2 bis 1:1 (ZINKL 1981).

Mehrkernigkeit, das ist das Vorkommen mehrere Kerne in einer Zelle, resultiert aus einer oder mehreren Kernteilungen ohne gleichzeitige Zellteilung. Sie ist nicht unbedingt ein Malignitätszeichen. Erst wenn die Größe der Kerne variiert, ist ein deutlicher Hinweis auf Malignität gegeben (DE NICOLA u. REAGAN 1998).

Mitosen sind im normalen Gewebe in zytologischen Präparaten selten nachweisbar. Ist eine erhöhte Anzahl an Mitosen, auf Grund einer erhöhten Proliferationsrate im Präparat zu sehen, muss deren Interpretation dennoch mit Vorsicht erfolgen. Werden abnorme Mitosefiguren gefunden, bei denen sich das Kernmaterial in mehr als zwei Richtungen oder mit unterschiedlichen Anteilen teilt, ist das Vorliegen einer malignen Erkrankung sehr wahrscheinlich (DE NICOLA u. REAGAN 1998).

Bei gutartigen und nicht-neoplastischen Zellen ist die Chromatinstruktur fein granulär bis fein verklumpt, abhängig vom jeweiligen Organ. Aufgrund der Chromatinvermehrung bei malignen Zellen wird die Struktur gröber und unregelmäßig (DE NICOLA u. REAGAN 1998).

Die Kerndeformation durch Kompression von außen oder durch Mehrkernigkeit wird als „Nuclear molding“ bezeichnet (molding = Verformung). Sie ist ein zytologisches Zeichen für den Verlust der Kontakthemmung und Ausdruck abnormer Proliferation maligner Prozesse (DE NICOLA u. REAGAN 1998).

Ebenso wie der Kern ändern sich die Kernkörperchen in Größe, Gestalt und Anzahl. Sind die Kernkörperchen normalerweise klein, rund und uniform, kommen bei malignen Prozessen Makronucleoli (Durchmesser > 5 µm), eckige Nucleoli und Anisonukleolose vor (DE NICOLA u. REAGAN 1998).

### 2.3.2.3 Zytoplasmatische Kriterien

Die zytoplasmatischen Kriterien sind von geringerer Bedeutung (REBAR 1980b). Zytoplasmatische Basophilie tritt zwar häufig bei Malignität auf, ist aber auch bei vielen nicht-neoplastischen teilungsaktiven Zellen oft zu beobachten. Der hohe Gehalt an Ribonukleinsäure (RNS) bedingt die tiefe basophile Anfärbbarkeit des Zytoplasmas und ist letztendlich Zeichen einer sehr aktiven Proteinsynthese (ZINKL 1981).

Die zytoplasmatische Vakuolenbildung ist entweder Hinweis auf einen degenerativen Prozess oder deutet auf eine sekretorische Aktivität z.B. bei Drüsenepithel hin und stellt kein spezifisches Malignitätskriterium dar (REBAR et al. 1982).

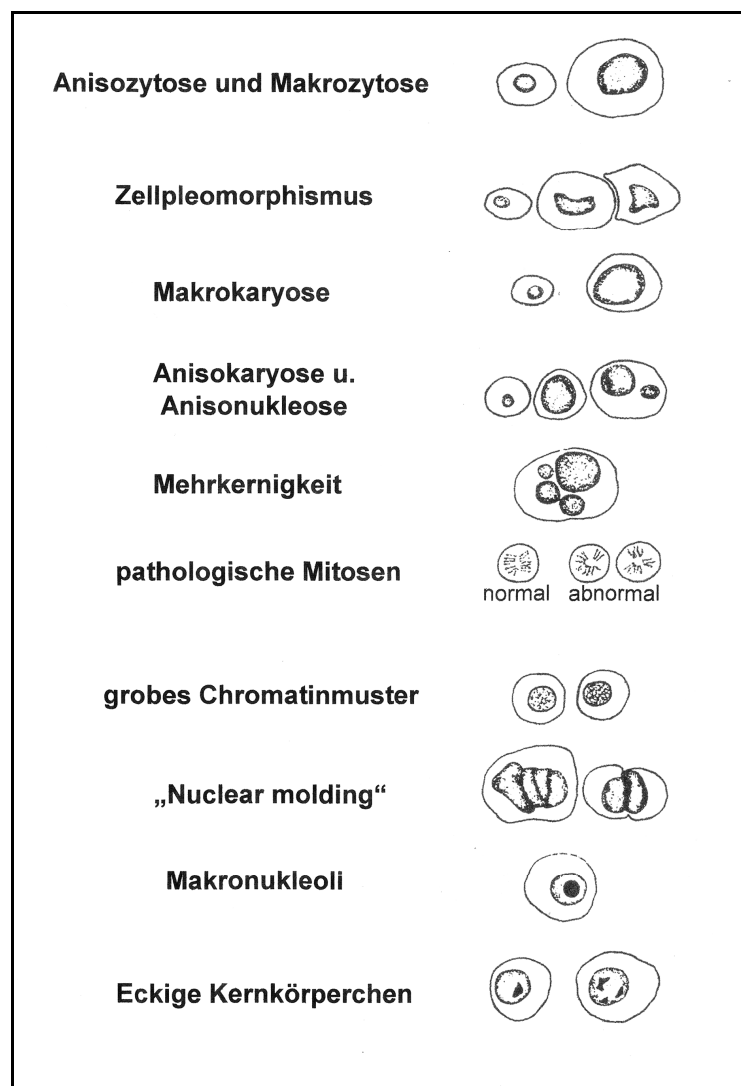


Abb. 8: Zytologische Malignitätskriterien nach TYLER et al. (1989)

### **2.3.3 Merkmale epithelialer Tumoren**

Zu den epithelialen Neoplasien gehören Geschwülste, die vom Oberflächen- oder Drüsenepithel ausgehen. Typische Vertreter sind unter anderem das Plattenepithelkarzinom oder das Adenokarzinom bzw. Adenom. Epitheliale Tumoren exfoliieren meist relativ gut, so dass zellreiche Präparate gewonnen werden können (WELLMAN 1990). Aufgrund ihrer starken Verbindung untereinander sind die Zellen in Verbänden angeordnet. Bei Präparaten aus Drüsengewebe liegen die Zellen häufig in azinärer Anordnung um ein Lumen (REBAR 1980a; DE NICOLA u. REAGAN 1998). Die Zellen sind groß bis sehr groß, haben reichlich Zytoplasma und einen runden Kern (siehe Ab. 9) (TYLER et al. 1989). Drüsenzellen enthalten große Vakuolen mit sekretorischen Produkten (REBAR 1980a). Epitheliale Neoplasien sind oft ulzeriert und Infektionen erschweren unter Umständen die Diagnosestellung (TYLER et al. 1989).

### **2.3.4 Merkmale mesenchymaler Tumoren**

Tumoren mesenchymalen Ursprungs sind Geschwülste des Binde- und Stützgewebes, z.B. Fibrome/Fibrosarkome, Lipome/Liposarkom, Osteosarkome und Hämangiosarkome. Die Präparate sind in der Regel zellarm, da die Zellen in ein Matrixnetzwerk eingebettet sind und schlecht exfoliiert werden (HALL u. MACWILLIAMS 1988). Meist sind sie einzeln gelagert, spindelförmig mit zytoplasmatischen Ausläufern und schlecht erkennbaren Zellgrenzen (siehe Abb. 9) (WELLMAN 1990). Die kleinen bis mittelgroßen Zellen haben einen runden bis ovalen Kern mittlerer Farbintensität und ein raues bis feinspritziges Chromatmuster. Der Nukleolus ist normalerweise nicht sichtbar (TYLER et al. 1989). Ist kollagene, chondroide oder osteoide Matrix vorhanden, kann das für die Erkennung des Ursprungsgewebes hilfreich sein (STIRTZINGER 1988). In einer prospektiven Studie wurde die Aussagekraft der Zytologie bei der Diagnostik von Weichteilsarkomen überprüft. Bezüglich der Dignität und der Histogenese wurde mit der Zytologie eine hohe Sensitivität, Spezifität und diagnostische Sicherheit erzielt (STOCKHAUS et al. 2003). Für die Diagnostik von Fibrosarkomen sind rundzellige Fibroblasten, eine erhöhte Mitoserate, Chromatinkondensation, Kernmembranverdickung und ein erhöhter Anteil an Kollagenmatrix sichere Merkmale der Malignität. Nicht spezifische Kriterien sind die hohe Zellularität der Fibroblasten, ein geringer Entzündungszellanteil und die Zell- bzw. Kerngröße (TAMMENA et al. 2004).

### 2.3.5 Merkmale der Rundzelltumoren

Tumoren vom Rundzelltyp sind eine zytologisch definierte Gruppe von Tumoren. Neoplasien von diesem Typ bestehen aus einzelnen, ungeordneten, runden oder ovalen Zellen ohne Verbindung zueinander. Hierunter fallen z.B. Lymphome, Mastzelltumore, Histiocytoome oder Plasmazytome (REBAR 1980a; HALL u. MACWILLIAMS 1988). Die Zellen sind klein bis mittelgroß mit einem runden bis ovalen Kern, feingranuliertem Chromatinmuster und unregelmäßig vorhandenem Nukleolus. Das Zytoplasma ist klar bis blassblau und kann Vakuolen enthalten (siehe Abb. 9) (HALL u. MACWILLIAMS 1988). Die Zellgrenzen sind gut sichtbar und es zeigen sich keine Zell-zu-Zellverbindungen (WELLMAN 1990).

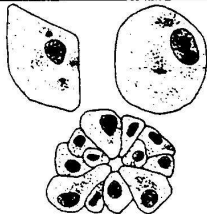



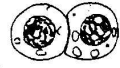
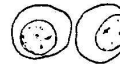
Art des Tumors	Ungefähre Zellgröße	Ungefähre Zellform	Schematische Darstellung	Zellgehalt des Punkts	Vorkommen von Zellklumpen oder -haufen
Epithelial*	Groß	Rund bis länglich		i.d.R. hoch	Ja
Mesenchymal (Spindelzellen)	Klein bis mittel	Spindel- bis sternförmig		i.d.R. gering	Nein
Einzelne Rundzellen	Klein bis mittel	Rund	   	i.d.R. hoch außer bei Histiocytoomen	Nein

Abb. 9: Schematische Darstellung zytologischer Merkmale der drei zytologischen Klassifizierungen (epithelial, mesenchymal, Rundzellen) maligner Neoplasien, Abbildung nach TYLER et al. (1989).

### 2.4 Zytopathologische Diagnostik von Entzündungen

Entzündungsreaktionen sind zytologisch dadurch gekennzeichnet, dass Entzündungszellen als prädominante Zellen im Präparat vorliegen (REBAR 1980b). Zu den Entzündungszellen zählen neutrophile und eosinophile Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, Mastzellen, Monozyten, Makrophagen, Epitheloidzellen und Riesenzellen. Der Entzündungstyp wird durch das Vorkommen und Verhältnis der verschiedenen Zellen festgelegt (TYLER et al. 1989).

### **2.4.1 Akute Entzündung**

Bei akuten Entzündungen sind neutrophile Granulozyten mit einem Anteil von 70% oder mehr an der Gesamtpopulation die dominierende Zellart (REBAR et al. 1982; TYLER et al. 1989). Abhängig von der Ätiologie des Prozesses unterscheidet man degenerierte und nicht-degenerierte neutrophile Granulozyten (HALL u. MACWILLIAMS 1988).

### **2.4.2 Subakute Entzündung**

Die subakute (chronisch-aktive) Entzündung wird zytologisch als eine Reaktion definiert, bei der 50 bis 70% der Entzündungszellpopulation aus neutrophilen Granulozyten besteht, der Rest aus Monozyten, Makrophagen und lymphoiden Elementen (REBAR et al. 1982). Auch hier wird zwischen degenerativen und nicht-degenerativen Prozessen unterschieden. Oft treten chronisch-aktive Entzündungen bei mäßig schweren Gewebeirritationen, zum Beispiel durch Fremdkörper oder Mykosen auf (REBAR 1980b).

### **2.4.3 Chronische Entzündung**

Die chronische Entzündung wird durch eine variable Anzahl an nicht-degenerierten neutrophilen Granulozyten, Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen charakterisiert (HALL u. MACWILLIAMS 1988). Sie deuten auf geringgradige Irritationen hin und werden häufig, ebenso wie die subakute Entzündung, bei mykotischen Infektionen oder sterilen Fremdkörperreaktionen gesehen (REBAR 1980b).

Die granulomatöse Entzündung stellt eine Sonderform dar, gekennzeichnet durch das Vorkommen von Riesenzellen und Epitheloidzellen. Auslöser sind auch hier Systemmykosen und Fremdkörperreaktionen (REBAR 1980b).

### **2.4.4 Entzündungszellen**

Neutrophile Granulozyten erfüllen neben der Phagozytose und dem intrazellulären Abbau zahlreicher unspezifischer Substanzen vor allem zwei wichtige Aufgaben: Abtötung von Mikroorganismen und Abgabe von lysosomalen Enzymen und anderen Mediatoren. So dienen sie zum einen dem Schutz des Organismus, tragen aber auch

zur Entzündung bei und können zur Schädigung von Geweben führen (MESSOW u. HERMANNNS 1990).

Eosinophile Granulozyten sind zur amöboiden Eigenbewegung und zur Phagozytose befähigt. Ihre Hauptfunktion wird in der phagozytotischen Beseitigung von Antigen-Antikörper-Komplexen, vor allem bei allergischen Entzündungsreaktionen, Allergien und Parasitosen gesehen (LIEBICH 1990a).

Monozyten zirkulieren nach Verlassen des Knochenmarks ein bis zwei Tage im peripheren Kreislauf, wandern dann in das Gewebe. In den Organen werden sie zu relativ ortsfesten Makrophagen (HEES u. TSCHUDI 1990; MESSOW u. HERMANNNS 1990).

Makrophagen produzieren zahlreiche Substanzen verschiedener Mediatorsysteme, zum Beispiel Lysozym und einige Komplementfaktoren. Außerdem erfüllen sie wichtige Funktionen in der Immunabwehr, vor allem durch Antigenpräsentation. Durch Phagozytose werden unter anderem gealterte Erythrozyten, Immunkomplexe, Erreger und auch Tumorzellen beseitigt (MESSOW u. HERMANNNS 1990).

Lymphozyten sind frei amöboid beweglich und können aus der Blut- und Lymphbahn in den Interzellularraum der Oberflächenepithelien wandern. Die Lymphozyten der Darmschleimhaut lassen sich weiter nach ihrer Anfärbbarkeit des Zellkernes in dunkle und helle Lymphozyten unterscheiden. Es werden T- und B-Lymphozyten unterschieden. Während T-Lymphozyten für die zellgebundene Immunantwort verantwortlich sind, sind die B-Lymphozyten für die humorale Immunreaktion zuständig und führen zur Bildung spezifischer Antikörper (LIEBICH 1990a). Unter dem Einfluss aktivierter T-Zellen setzt die Transformation von B-Zellen in Immunoblasten (Lymphoblasten) ein, die sich nach mehrfacher Teilung innerhalb 72 Stunden über Proplasmozyten zu Plasmazellen differenzieren.

Eine Sonderform sind die großen granulierten Lymphozyten („large granular lymphocytes“). Im englischen werden sie auch oft als „globule leucocytes“ bezeichnet. Ihr Vorkommen ist bei verschiedenen Spezies (Mensch, Hund, Katze, Labornager, Wiederkäuer, Schwein) beschrieben worden (AKPAVIE u. PIRIE 1989). Sie zählen zu einer Subpopulation der Lymphozyten, da sie sich mit Markern für T-Zellen oder natürliche Killerzellen markieren lassen. Die großen granulierten Lymphozyten im Gewebe stammen aus der Zirkulation, ihr Ursprung ist das Knochenmark. Die Funktion dieser Zellen ist noch nicht vollständig charakterisiert. Im

Darm sind sie in der Antigen-Erkennung und Regulation der Schleimhaut-Immunität involviert (WELLMAN 2000). Des Weiteren spielen sie eine große Rolle bei entzündlichen Reaktionen bei parasitären Infektionen (AKPAVIE u. PIRIE 1989; AKPAVIE u. PIRIE 1993). Die Granula ähneln Lysosomen und enthalten Substanzen, die Zellyse auslösen. Außerdem wurden verschiedene Proteasen und Proteoglykane in den Granula identifiziert (WELLMAN 2000).

Zytologisch sind sie mononukleäre Zellen mit einem runden bis ovalen, exzentrischen Kern aus homogenem Chromatin. Das Zytoplasma ist hellgrau und angefüllt mit großen, kräftig pink gefärbten Granula unterschiedlicher Größe (BAERT u. FREDERIX 1985; COLES et al. 1987). Im intestinalen Epithel sind sie im Bereich der Krypten und niedrigeren Villi und in der Lamina propria lokalisiert. Daneben konnten sie auch in vielen anderen Geweben bei gesunden Individuen verschiedener Spezies nachgewiesen werden (WELLMAN 2000).

In der Literatur lassen sich nur wenige Berichte über das Auftreten von großen granulierten Lymphozyten bei Hunden und Katzen finden. In einer humanmedizinischen Studie wurde der Hund als ein Modell für Asthma genutzt und in diesem Zusammenhang auch große granulierten Lymphozyten beim Hund beschrieben (BALDWIN u. BECKER 1993). Bei der Katze wurden Neoplasien der großen granulierten Lymphozyten im Darm beschrieben (FINN u. SCHWARTZ 1972; HONOR et al. 1986).

Plasmazellen synthetisieren spezifische  $\gamma$ -Immunglobuline. Aus ihnen entstehen die langlebigen Gedächtniszellen (LIEBICH 1990a).

Die Form der Mastzelle ist sehr variabel. Die zytoplasmatischen Mastzellgranula enthalten unter anderem Histamin, Heparin und andere Mediatoren. Sie wirken durch die Freisetzung von Histamin auf die glatte Muskulatur von Arteriolen, aber auch von Darm und Bronchien. Des Weiteren erhöhen sie die Gefäßpermeabilität unter entzündlichen Bedingungen und spielen eine große Rolle bei Überempfindlichkeitsreaktionen vom anaphylaktischen Typ (WEISS 1990).

Es können sekretorische und aktivierte Epitheloidzellen unterschieden werden. Der aktivierte Typ hat eine ähnliche Funktion wie aktivierte Makrophagen und kommt vor allem in Granulomen vor, während der sekretorische Typ durch die Sekretion biologisch aktiver Stoffe gekennzeichnet ist (MESSOW u. HERMANNNS 1990)

Mehrkernige Riesenzellen entstehen durch die Fusion von bis zu 100 Exsudat-Makrophagen und stellen somit Synzytien dar. Es wird die Fremdkörper-Riesenzelle und Langhans'schen Riesenzelle unterschieden. Bei den Fremdkörper-Riesenzellen liegen die Zellkerne ungeordnet im Zytoplasma, während diese bei Langhans'schen Riesenzellen kranzartig in der Peripherie angeordnet sind (WEISS 1990).

## **2.5 Die Histologie des Dünndarms**

Es können vier Hauptschichten festgestellt werden: Die das Lumen auskleidende Schleimhaut (Tunica mucosa), bestehend aus dem Oberflächenepithel (Lamina epithelialis mucosae), der Lamina propria mucosae aus lockerem Bindegewebe und der Lamina muscularis mucosae, einer Schicht glatter Muskelzellen. Die Tela submucosa, die Verschiebeschicht gegenüber der darunter liegenden Muskelschicht, enthält lockeres Bindegewebe, Blutgefäße und Nerven. Die Muskelschicht (Tunica muscularis), besteht aus einer inneren Zirkulärfaserschicht und einer äußeren Längsfaserschicht. Und abschließend die Tunica serosa, eine Schicht aus einschichtigem Plattenepithel (Lamina epithelialis oder auch Mesothel genannt) und der Lamina propria serosae aus lockerem Bindegewebe. Das intramurale Nervensystem umfaßt den in der Tela submucosa liegenden Plexus submucosus und den Plexus myentericus zwischen den Muskelschichten der Tunica muscularis (MOSIMANN u. KOHLER 1990).

Das Oberflächenepithel der Darmzotten geht kontinuierlich in das Epithel der Glandulae intestinales (Darmeigendrüsen, Lieberkühnsche Krypten) über. Diese liegen als unverzweigte tubuläre Drüsen in der Lamina propria mucosae und münden zwischen den Zotten (LIEBICH 1990b). Es lassen sich verschiedene Zelltypen erkennen:

Die Enterozyten sind hochprismatische Zellen mit längsovale, locker strukturiertem Kern. Sie sind die häufigste Zellpopulation. Im basalen Bereich bestehen interzelluläre Spalten, in die Lymphozyten aus der Lamina propria mucosae eindringen. Lumenseitig tragen sie einen auch lichtmikroskopisch im histologischen Schnitt gut sichtbaren Bürstensaum aus Mikrovilli (LIEBICH 1990b).

Die Becherzellen enthalten schleimhaltige Granula im Zytoplasma, der Zellkern wird in die Basisregion gedrückt. Das Sekret der Granula dient als Schutzüberzug für das Darmepithel. Die Zahl der Becherzellen ist in der Drüsenregion größer als im



Zottenepithel. Insgesamt steigt die Anzahl vom Duodenum zum Ileum kontinuierlich an (LIEBICH 1990b). Im Duodenum kommen auf 100 Enterozyten im Mittel 3,6 Becherzellen im Bereich der Zottenspitze und 9,3 im Bereich der Krypten vor. Die Anzahl ist aber auch von äußeren Faktoren abhängig (GERMAN et al. 1999).

Die gastrointestinalen endokrinen Zellen, zum Beispiel die Gastrin- und Sekretin-Zellen, kommen einzeln oder in Gruppen neben den üblichen Epithelzellen vor. Sie produzieren physiologisch hochaktive Substanzen, neben Serotonin auch zahlreiche Polypeptidhormone, welche die Verdauungstätigkeit regulieren und den Kohlenhydratstoffwechsel beeinflussen. Das Zytoplasma speichert Sekretgranula, die Aminosäuredekarboxylasen enthalten. Alle endokrinen Zellen, die Aminosäuredekarboxylasen einschließen, werden als APUD-Zellen (Amine and Precursors Uptake and Decarboxylation) zusammengefasst (LIEBICH 1990b).

Die Lamina propria mucosae bildet die Grundlage für die Darmzotte. Diese enthält neben lockerem Bindegewebe Blutkapillaren, kapilläre Lymphgefäße, glatte Muskelzellen und lymphoretikuläres Gewebe. Das lymphoretikuläre Gewebe ist reich an T- und B-Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten, Makrophagen, Mastzellen sowie neutrophilen und eosinophilen Granulozyten. Sämtliche lymphoretikulären Zellsysteme der intestinalen Schleimhaut werden unter dem Begriff GALT (Gut associated lymphoid Tissue) zusammengefasst.

## **2.6 Die Zytologie des Darmkanals**

Die Enterozyten haben einen basophilen runden bis ovalen Kern aus rauem bis feingepüpftem Chromatin und einem undeutlichen Kernkörperchen. Der mäßige Anteil des Zytoplasmas erscheint hell-basophil und enthält apikal große klare Schleimvakuolen. Die Zellgrenzen sind undeutlich und einige Schleimgranula liegen extrazellulär (ANDREASEN et al. 2000).

Panethzellen enthalten grob eosinophil granuliertes Zytoplasma und sind schwer von den schleimproduzierenden Zellen zu unterscheiden (ANDREASEN et al. 2000). Sie liegen am Grund der Dünndarmdrüsen und sezernieren Lysozym, eine Substanz, die wichtige Bestandteile bakterieller Zellwandstrukturen auflöst und so einen wichtigen Beitrag zur Erhaltung des mikrobiellen Gleichgewichtes im Darmtrakt liefert (LIEBICH 1990b).

Lymphozyten, Plasmazellen, und granulierten Lymphozyten können auch bei gesunden Hunden in der Zytologie erkannt werden. Bakterien sind in zytologischen Darmpräparaten normalerweise nicht oder nur in sehr geringer Anzahl vorhanden (BAKER u. LUMSDEN 2000). Makrophagen, neutrophile und eosinophile Granulozyten sowie Mastzellen stellen insgesamt weniger als 1% der Leukozyten in der Lamina propria dar (HANAUER u. KRAFT 1985; VAN GARDEREN et al. 1991).

Die Zytologie von endoskopisch gewonnenen Schleimhautbiopsien aus dem Magen-Darm-Trakt ist eine nützliche Zusatzuntersuchung zur histopathologischen Untersuchung (JERGENS et al. 1998). Die Bürstenzytologie eignet sich mehr zur Erkennung zellulärer Infiltrate in der Lamina propria. Akute Schleimhautentzündungen, einhergehend mit einer erhöhten Anzahl neutrophiler Granulozyten, können besser mit der Abklatschzytologie dargestellt werden. Beide Methoden ergänzen sich und sollten gemeinsam zur Diagnostik von Magen-Darmerkrankungen herangezogen werden (JERGENS et al. 1997).

In Studien, sowohl beim Kleintier als auch beim Menschen, konnte eine hohe Diagnose-Genauigkeit für die Abklatsch- und Bürsten-Technik im Vergleich zur histopathologischen Untersuchung nachgewiesen werden (WANG et al. 1991; O'DONOGHUE et al. 1995; JERGENS et al. 1997; JERGENS et al. 1998; JERGENS et al. 2000). Von 85 Hunden und 23 Katzen wurden die zytologischen Diagnosen endoskopisch gewonnener Schleimhautbiopsien aus Magen, Dünn- und Dickdarm mit parallel durchgeführten histologischen Untersuchungsergebnissen verglichen (JERGENS et al. 1998). In dieser Untersuchung wurden zytologische Präparate sowohl mit der Abklatsch- als auch mit der Bürstentechnik hergestellt. Die Färbung erfolgte nach Giemsa oder Wright. Für die objektive Beurteilung wurde ein Bewertungssystem erstellt, das folgende Kategorien umfasste: Entzündungszellen (neutrophile Granulozyten, Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophile Granulozyten und Makrophagen), „atypische“ Zellen, epitheliale Zellen, Spiralbakterien, Bakterienflora, Blutung, Debris oder Ingesta sowie Mukus. Die Größe der Lymphozyten und vorkommende Mastzellen wurden nicht beurteilt. Die Einteilung der Entzündungszellen und der atypischen Zellen erfolgte in einer Skala von 0 bis 7, entsprechend 0 bis  $\geq 7$  Zellen je Ölimmersionsfeld (50x). Ähnlich wurde die Bewertung der epithelialen Zellen durchgeführt. Es wurden mindestens zehn Gesichtsfelder auf jedem Objektträger ausgewertet. Für jeden Hund und jede Katze wurde eine zytologische Diagnose gestellt und diese mit der Histologie verglichen. Ein Viertel

von 92 Dünndarmpräparaten wurde histologisch als normal befundet. Die Hälfte wies Zeichen einer lymphoplasmazellulären Entzündung auf. Der Rest wurde histologisch als eosinophile Entzündung, gemischte Entzündung, Lymphangiektasie, Atrophie oder Fibrose sowie Lymphosarkom beschrieben. Es bestand eine gute Korrelation zwischen den zytologischen und den histologischen Ergebnissen.

## **2.7 Das gastrointestinale Immunsystem**

Das Darm-assoziierte lymphatische Gewebe (Gut associated lymphoid Tissue = GALT) spielt eine Schlüsselrolle bei der lokalen und systemischen Immunität. Es stellt 50% des schleimhautassoziierten lymphoiden Gewebes im Körper dar. Aufgabe ist es, den Körper vor exogenen Antigenen von Mikroorganismen und Futterbestandteilen zu schützen. Gleichzeitig muss aber auch eine Toleranz gegenüber harmlosen Antigenen, zum Beispiel den endogenen Bakterien und Futterbestandteilen, gewährleistet werden (JAMES 1993; GERMAN 2001; GARDEN 2001a). Wenn die passende IgA-Antwort und angeborene Barrieren gegen virale und bakterielle Infektionen fehlen, entfalten sich protektive Immunreaktionen, wie Komplementaktivierung, Opsonierung, Phagozytose, Aktivierung der zytotoxischen T-Zellen, natürlichen Killerzellen, IgG und IgM. Vor allem zelluläre Immunantworten sind wichtig für die Bekämpfung von Protozoen- und Helmintheninfektionen (GARDEN 2001a).

Das GALT umfasst einerseits die mesenterialen Lymphknoten, einzelne Lymphknötchen, Peyer'sche Plaques und subepitheliale Lymphfollikel auf der afferenten Seite, wo sich primäre Immunreaktionen während der initialen Auseinandersetzung mit Antigenen abspielen, andererseits die Leukozyten in der Lamina propria, im Epithel und Lumen auf der efferenten Seite, wo die Wirkungsfunktionen durch folgende Antigenseitensetzungen stattfinden. Die zwei Seiten des GALT stehen durch Migration von aktivierten Lymphozyten in Verbindung. Aktivierte Lymphozyten gelangen von der afferenten Seite in die Blutbahn und werden selektiv von den Zellen der efferenten Seite über endotheliale Venuolen angezogen (siehe Abb. 10) (VAN GARDEREN et al. 1991; GARDEN 2001a).

Die Lymphknötchen kommen überall im Darm vor. Sie enthalten einzelne Follikel lymphoider Zellen, sind 0,5 bis 3 mm groß und erstrecken sich von der Lamina propria bis in die Submukosa (EVANS u. CHRISTENSEN 1979).

Die Peyer'schen Plaques im Dünndarm bestehen aus einer Zusammenballung von Lymphfollikeln. Im Darm des Hundes sind annähernd 20 solcher Plaques zu finden, die im Durchmesser von wenigen mm bis zu 4 cm variieren (STEWART et al. 1980). Sie sind von einem follikelassoziierten Epithel überzogen, welches aus kuboiden, absorptiven Epithelzellen, Becher- und M-Zellen besteht.

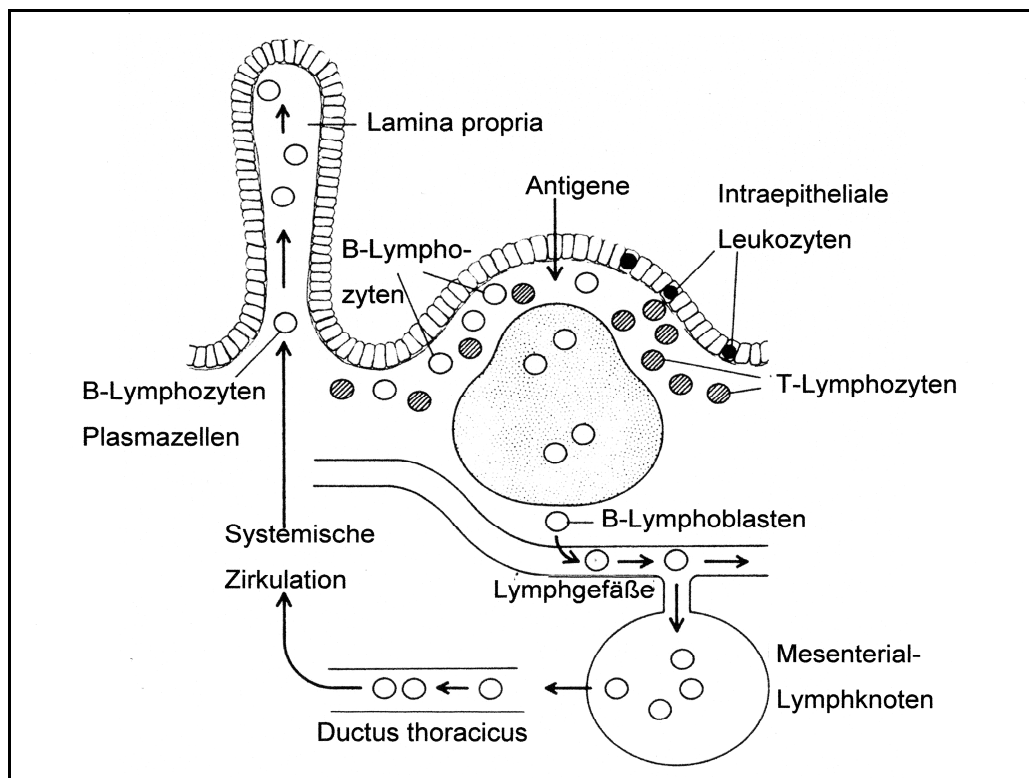


Abb. 10: Schematische Darstellung des Darm-assoziierten lymphatischen Gewebes nach HALL u. SIMPSON (2000)

Die M-Zellen fallen lichtmikroskopisch nur durch eine Unterbrechung des intestinalen Bürstensaumes auf (EGBERTS et al. 1985). Ihre Funktion besteht in der Aufnahme von kleinen Mengen luminaler Antigene und deren Transport zu den Makrophagen und lymphoiden Geweben, welche für die Immunantwort verantwortlich sind. An der Oberfläche enthalten sie spezifische Rezeptoren für pathogene Mikroorganismen. Das lymphoide Gewebe der Peyer'schen Plaques besteht aus dem Follikel, gebildet von B-Zellen und einigen T-Helferzellen, dem Mantel aus einer Mischung von B- und T-Zellen, sowie Makrophagen und dem interfollikulären Gewebe, das hauptsächlich T-Zellen enthält, aber auch einige B-Zellen als Vorstufen der IgA-sezernierenden Plasmazellen (BIENENSTOCK u. BEFUS 1984).

Des Weiteren wird die Schleimhaut durch innere und äußere Epithelkomponenten geschützt. Die äußeren Komponenten werden durch luminale Faktoren der Enterozyten gebildet. Der wichtigste Faktor ist hier das Immunglobulin A, welches die Passage von Antigenen durch die Schleimhaut limitiert. Strukturen und Funktionen des Epithels selbst bilden die inneren Komponenten. Hier kommen den Enterozyten mit den „Tight-junctions“ (feste Verbindungen zwischen den Zellen ohne interzellulären Spalt), den Mikrovilli, der Plasmamembran, den Organellen und den zytoplasmatischen Enzymen wichtige Bedeutungen zu (GERMAN 2001).

Den größten Anteil des gastrointestinalen Immunsystems bilden die T- und die B-Lymphozyten, Mastzellen, dendritische Zellen und Granulozyten in der Lamina propria und die intraepithelialen Leukozyten (JAMES 1993). Intraepitheliale Leukozyten (IEL) liegen zwischen den Enterozyten. In vielen histologischen und immunhistologischen Studien bei verschiedenen Spezies ist die Anzahl der IEL im Darm quantifiziert worden. Hierbei werden unterschiedliche Methoden angewendet. Die häufigste Methode ist die Quantifizierung der IEL in Relation zu den Epithelzellen. Seltener erfolgt die Zählung in Relation zum Schleimhautvolumen (VAN GARDEREN et al. 1991).

Im Dünndarm von Mäusen wurden 14-16 IEL je 100 Epithelzellen gezählt (FERGUSON u. PARROTT 1972). Ähnliche Ergebnisse sind in der Humanmedizin erzielt worden (AUSTIN u. DOBBINS 1982). Auch im Jejunum gesunder Hunde stellen annähernd 11-15 von 100 Zellen im Epithel intraepitheliale Lymphozyten dar. Ihre Anzahl ist bei früh entwöhnten Welpen und im Ileum des erwachsenen Hundes etwas geringer (THOMAS u. ANDERSON 1982). Bei Exposition mit mikrobiellen Antigenen erhöht sich ihre Anzahl bis auf das fünffache der ursprünglichen Population (CARMAN et al. 1986). Mit immunhistologischen und Computer gestützten morphometrischen Analysen wurde die Verteilung der IEL sowohl innerhalb der einzelnen Darmabschnitte als auch innerhalb des Darmepithels untersucht. Beim gesunden Hund nimmt ihre Anzahl sowohl vom Duodenum in Richtung Ileum, als auch von der Villusspitze in Richtung Kryptepithel ab. Im Bereich des Villus konnten pro 100 Epithelzellen 21 IEL gezählt werden (GERMAN et al. 1999). Ähnliche Ergebnisse brachten auch durchflusszytometrische Untersuchungen der IEL aus dem Dickdarm und Dünndarm bei gesunden Hunden. Die meisten IEL gehören zu den T-Lymphozyten (SONEA et al. 2000). Daneben sind in geringem Umfang auch eosinophile Granulozyten, große granulierte Lymphozyten vom

natürlichen Killerzelltyp, B-Lymphozyten und Mastzellvorstufen vorhanden (BEFUS et al. 1984; CARMAN et al. 1986; VAN DER HEIJDEN u. STOK 1987; TARGAN et al. 1987; SONEA et al. 2000; WELLMAN 2000).

Im Gegensatz zum intraepithelialen Kompartiment liegen in der Lamina propria vorwiegend B-Lymphozyten (BARLOUGH et al. 1981; WILLARD et al. 1982). Die relative Anzahl von B- und T-Zellen sowie anderen Leukozyten im Darm ist abhängig von der Antigen-Stimulation, dem Alter des Tieres und der Lokalisation. Beim Hund sind die meisten B-Lymphozyten im Duodenum zu finden. Ihre Anzahl nimmt bis zum Kolon stetig ab (WILLARD u. LEID 1981; WILLARD et al. 1982).

Neuere Studien beschreiben die normale Verteilung der T- und B-Lymphozyten sowohl innerhalb der Darmabschnitte als auch innerhalb einer Zotte im Dünndarm von gesunden Hunden (ELWOOD et al. 1997). In der Lamina propria steigt die Dichte der T-Lymphozyten innerhalb der Zotte in Richtung Villusspitze des Darmes an. Es sind hier keine sichtbaren Unterschiede in der Verteilung von T-Lymphozyten, T-Helferzellen und T-Zellen vom Suppressor- und zytotoxischen Typ zu erkennen (BIENENSTOCK u. BEFUS 1984; HANAUER u. KRAFT 1985; HARTY u. LEIBACH 1985; CARMAN et al. 1986; JAMES 1993; ELWOOD et al. 1997). Studien haben gezeigt, dass die Dünndarmschleimhaut des Hundes quantitativ gleiche Leukozytenpopulationen enthält, wie sie auch bei anderen Spezies gefunden wurde (ELWOOD et al. 1997).

Genauere Untersuchungen zur Differenzierung der Leukozytenpopulation basieren auf immunhistochemischen und Computer gestützten morphometrischen Analysen, wie sie auch bei gesunden Hunden durchgeführt wurden (GERMAN et al. 1999). Die Zählung der Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen in der Lamina propria erfolgte hier in einem Feld von  $10.000\ \mu\text{m}^2$ . Sowohl die totale Zellzahl als auch die Zahl der Entzündungszellen erhöhte sich im Duodenum jeweils von der Villusspitze über die Villusbasis zur Kryptenregion. Für die totale Zellzahl konnten 100-150 Zellen/ $10.000\ \mu\text{m}^2$  gezählt werden. Plasmazellen, eosinophile Granulozyten und Mastzellen werden vorwiegend in der Kryptenregion gesehen, während T-Lymphozyten vor allem im Bereich der Villusspitze liegen. Im Bereich der Villusbasis sind hauptsächlich B-Lymphozyten zu finden (GERMAN et al. 1999).

### **2.7.1 Einfluss des Alters auf das Immunsystem**

Welpen werden mit einem relativ kompetenten, aber noch unreifen Immunsystem geboren. Schon kurz nach der Geburt ist es in der Lage, auf externe Stimuli zu reagieren. Die Reifung erfolgt innerhalb weniger Wochen (TOMAN et al. 2002; FALDYNA et al. 2005).

Unmittelbar nach der Geburt ist die Anzahl der neutrophilen Granulozyten im peripheren Blut etwa dreimal höher, als die der Lymphozyten. Dieses Verhältnis verändert sich innerhalb der ersten Lebenswoche (TOMAN et al. 2002). Die Zahl der Neutrophilen erreicht etwa im Alter von einem Monat einen Wert ähnlich dem erwachsener Hunde (STRASSER et al. 2000; TOMAN et al. 2002).

Die Anzahl von Lymphozyten im peripheren Blut ist in den ersten drei Monaten höher, als bei erwachsenen Hunden (TOMAN et al. 2002). Während bei Neonaten weniger T-Lymphozyten und mehr B-Lymphozyten vorhanden sind, kommt es mit zunehmendem Alter zu einem relativen Anstieg der T-Zellen und einer relativen Abnahme der B-Zellen. Das Verhältnis von T-Helferzellen zu T-Suppressorzellen bzw. zytotoxischen T-Lymphozyten wandelt sich innerhalb der ersten Wochen zu Gunsten von T-Suppressorzellen bzw. zytotoxischen T-Lymphozyten (STRASSER et al. 2000; FALDYNA et al. 2005).

Auch lymphoproliferative Reaktionen und Antikörper-Titer von jungen und mittelalten Hunden sind höher als bei alten Hunden (GREELEY et al. 1996).

Das gastrointestinale Immunsystem von neugeborenen Hunden ist ebenso wie das systemische Immunsystem noch sehr unreif (MANNICK u. UDALL, JR. 1996). Eine Schlüsselrolle für die Reifung des GALT spielt die Darmmikroflora (BENYACOUB et al. 2003). Sie repräsentiert eine „Bibliothek“ an verschiedenen Antigenen, die das Immunsystem modulieren (GARDEN 2001a). Im Darmepithel von sechs Wochen alten Hunden sind deutlich mehr intraepitheliale Leukozyten vorhanden, als bei Hunden die noch keine zwei Wochen alt sind. Im Alter von sechs bis 15 Wochen erreichen sie ihren Maximalwert, um dann wieder langsam abzufallen (THOMAS u. ANDERSON 1982). Dieser signifikante Anstieg bei Hunden im Entwöhnungsalter wird mit der Umstellung der Nahrung in Zusammenhang gebracht (THOMAS u. ANDERSON 1982).

Auch im höheren Alter verändert sich das gastrointestinale Immunsystem. In verschiedenen Modellversuchen an Mäusen konnte gezeigt werden, dass die

Zellinteraktionen in den Peyer'schen Plaques verloren gehen und damit eine Lücke der oralen Toleranz entsteht (FIOCCHI et al. 1983; KATO et al. 2003; FUJIHASHI u. MCGHEE 2004). Das führt zu einer altersabhängigen Dysregulation des Immunsystems mit Folge einer Schleimhaut einbeziehenden Gewebedysfunktion. Die Anzahl der T-Helferzellen nimmt in den Peyer'schen Plaques ab. Damit kommt es zu einer mangelhaften Zytokin-Synthese für die Induktion von sekretorischem IgA oder der oralen Toleranz (FUJIHASHI u. MCGHEE 2004).

### **2.7.2 Einfluss der Fütterung auf das Immunsystem**

Die Art der Fütterung ist für die Funktion des Magen-Darm-Kanals in vielerlei Hinsicht von großer Bedeutung. Die Integrität von immunologischen und nicht-immunologischen Barrieren in der Darmschleimhaut kann auch durch nutritive Einflüsse gestört oder gefördert werden (LANGKAMP-HENKEN et al. 1992). Diskutiert werden die positiven Eigenschaften von Probiotika auf die gastrointestinale Gesundheit. So hat *Lactobacillus* einen positiven Einfluss auf die gastrointestinale Gesundheit beim Hund. Die Anzahl von Immunglobulin A- und anderen Immunglobulin-sezernierenden Zellen in der intestinalen Schleimhaut steigt an, die lokale Freisetzung von Interferon wird stimuliert und der Antigentransport zu den Peyer'schen Plaques erleichtert (GORBACH 2000).

Ähnlich positive Effekte konnten bei Einhaltung eines bestimmten Fettsäure-Verhältnisses bei Hunden gefunden werden (KEARNS et al. 1999). Auch  $\beta$ -Karotine verbessern die Immunantwort nachweisbar (MASSIMINO et al. 2003).

Eine uneingeschränkte Kalorienaufnahme bei Hunden im Wachstumsalter führt zu einer verminderten Effizienz der zellulären Immunität und einer gesteigerten Autoimmunantwort im späteren Leben. Im Gegensatz dazu zeigt eine geeignete Kalorienrestriktion im Alter einen „verjüngenden“ Effekt auf die Kapazität des Immunsystems (SHEFFY u. WILLIAMS 1981; KEALY et al. 2002).

Es gibt weiterhin Untersuchungen über die Futtertoleranz des Hundes. Insbesondere Rassen zeigen häufig Futtermittelunverträglichkeiten (ZENTEK u. MEYER 1995). Es wurde nachgewiesen, dass die Zahl und Zusammensetzung der intra-epithelialen Leukozyten und der Leukozyten der Lamina propria bei Futtermittelunverträglichkeit unverändert bleibt (GERMAN 2001).



Bei Mäusen führt eine Proteinmangelernährung allein schon nach vier Tagen zu einem signifikanten Abfall der mononukleären Zellen sowohl in der Milz als auch in den Peyer'schen Plaques (MANHART et al. 2000).

Die Art des Futters, Dosen- oder Trockennahrung, der Proteingehalt und die Proteinquelle können zu Modulationen im Bereich der Bakterienflora mit beitragen (ZENTEK et al. 2003).

### **2.7.3 Einfluss der gastrointestinalen Mikroflora auf das Immunsystem**

Die intestinale Mikroflora ist normalerweise quantitativ und qualitativ stabil. Sie steht in einem symbiotischen Wechselspiel mit dem Wirt (GORBACH et al. 1967; SIMON u. GORBACH 1987). Im nüchternen Zustand ist der kraniale Dünndarm annähernd steril, mit der Futteraufnahme kommt es zu einer Vermehrung der Mikroorganismen. Vorwiegend säureresistente, grampositive Vertreter von Clostridien, Streptokokken, Laktobazillen, E. coli und Pilzen machen den größten Teil aus. Im kaudalen Teil des Dünndarms ist der Gehalt an Mikroorganismen nur geringen Schwankungen unterworfen. Die Zusammensetzung ähnelt immer stärker der des Kolons. Hier kommen vorwiegend anaerobe Bakterien der Gattung Bakteroides und Bifidobakter vor, neben Enterobakterien, Streptokokken und Laktobazillen (GORBACH 1971; DRASAR u. HILL 1974; SIMON u. GORBACH 1987).

Die beim erwachsenen Tier vorhandene Mikroflora ist bereits drei bis vier Wochen nach der Geburt in ähnlicher Zusammensetzung zu finden. Sofern keine Störfaktoren einwirken, bleibt sie zeitlebens relativ konstant erhalten (SMITH 1965; JERGENS 2001). Letztendlich hat jeder Hund sein individuelles Bakterienmuster. Dieses ist relativ stabil, unabhängig von der Zusammensetzung des Futters (SIMPSON et al. 2002).

Von der intestinalen Bakterienflora können auch Störfaktoren auf das Immunsystem einwirken. Enteropathogene E.coli-Keime hemmen zum Beispiel die Lymphokin-Produktion und damit die Lymphozytenfunktion im Blut und in der Lamina propria (HEYWORTH et al. 1985; MALSTROM u. JAMES 1998).

### **2.7.4 Einfluss von Parasiten auf das gastrointestinale Immunsystem**

Abhängig von der Haltung des Tieres, dem Alter, der Abstammung und auch dem Geschlecht ist der Infektionsdruck bezüglich intestinaler Protozoen und Helminthen

unterschiedlich groß. Besonders Tiere im Alter bis zu einem Jahr, intakte Rüden und Hündinnen sind häufig betroffen und schlechte hygienische Bedingungen erhöhen den Infektionsdruck (VISCO et al. 1977a; KIRKPATRICK 1988; BUGG et al. 1999; ITOH et al. 2003; RUBEL et al. 2003; RAMIREZ-BARRIOS et al. 2004).

Bei intestinalen Protozoen- und Helminthen-Infektionen kommt dem zellulären Immunsystem eine besondere Bedeutung zu (GARDEN 2001a). Unter anderem steigt die Zahl der Eosinophilen sowohl in der Lamina propria als auch im peripheren Blut an, wie in einer Untersuchung an Schafen nach Nematodeninfektion gezeigt werden konnte (DOUCH u. MORUM 1993).

Nematoden-infizierten Ratten haben mehr Lymphozyten, Plasmazellen, eosinophile Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen in der Lamina propria, während die Zellzahl mit zytoplasmatischen Immunglobulinen konstant bleibt (BEFUS u. BIENENSTOCK 1984).

Auch bei Hunden kommt es nach einer Infektion zu deutlichen immunologischen Reaktionen, die sich hauptsächlich lokal im Gastrointestinaltrakt abspielen. Es werden gesteigerte Zellproliferationen in den mesenterialen und poplitealen Lymphknoten und/oder in den Peyer'schen Plaques beobachtet (DEPLAZES et al. 1994).

## **2.8 Chronische Erkrankungen des Darmkanals beim Hund**

### **2.8.1 „Inflammatory bowel disease“**

Idiopathische, vermutlich immunvermittelte Erkrankungen des Darmkanals sind häufige Ursache von chronischem Erbrechen und Durchfall beim Hund. Der Begriff „Inflammatory bowel disease“ (IBD) umfasst eine Gruppe von Erkrankungen, die durch histologische Anzeichen einer Entzündung charakterisiert werden, einhergehend mit persistierenden oder wiederkehrenden gastrointestinalen Symptomen (JERGENS et al. 1992; JERGENS 1999).

Die Ursache der IBD ist unklar (JERGENS 2001). Interaktionen zwischen mukosalem Immunsystem, genetischer Prädisposition und Umweltfaktoren werden für die Entstehung von intestinalen Entzündungen verantwortlich gemacht. Dabei werden zwei generelle Hypothesen angenommen: 1. die Entzündung entsteht auf Grund einer abnormalen Immunantwort und 2. die Entzündung wird durch eine angemessene Immunantwort auf einen normalen luminalen Bestandteil oder ein

molekulares Element eingeleitet (JERGENS 2002). Klinische Zeichen sind Folge der zellulären Mukosainfiltration und der Entzündungsmediatoren.

Je nach der primär beteiligten Zellpopulation werden unterschiedliche Erkrankungen unterschieden, die auch Überschneidungen mit der diätetischen Hypersensitivität und dem „Small Intestinal Bacterial Overgrowth“ (bakterielle Überbesiedelung, siehe Kapitel 2.8.2) zeigen (DAY u. HALL 1999). Letztendlich ist IBD eine histologische Diagnose. In der Lamina propria ist eine deutliche Vermehrung der IgG-Plasmazellen, CD3<sup>+</sup> (T)-Zellen, CD4<sup>+</sup>(T)-Zellen, Makrophagen und Neutrophilen, neben einem verminderten Gehalt an Mastzellen festzustellen (siehe schematische Darstellung Tabelle 1) (GERMAN et al. 2001, GERMAN 2001). Die Infiltration der Lamina propria reflektiert eine immunologische Antwort auf diätetische, mikrobielle oder Autoantigene. Die gute Ansprechbarkeit auf Immunsuppressiva suggeriert einen Immundefekt als Auslöser.

Die idiopathische lymphozytäre-plasmazytäre Enteritis (LPE) ist die häufigste Form. Sie ist gekennzeichnet durch eine Infiltration der Schleimhaut vorwiegend mit Lymphozyten und Plasmazellen innerhalb der Lamina propria (JERGENS et al. 1992; DAY u. HALL 1999). Abhängig vom Schweregrad der Erkrankung kommt es histologisch zur partiellen oder kompletten Villusatrophie, Villusfusion oder Kryptabszessen. Es kann eine normale Schleimhaut oder Anzeichen einer Becherzellmetaplasie, Kryptenhypertrophie bis Dilatation sichtbar sein (DAY u. HALL 1999).

Manchmal ist die Unterscheidung einer schweren Form der IBD vom intestinalen malignen Lymphom sehr schwierig. So wurden verschiedene Versuche unternommen, histologische Kriterien zu erstellen, anhand derer der Schweregrad der LPE graduiert werden kann (JERGENS et al. 1992). Trotz allem gibt es keine gute Korrelation zwischen dem histologischen Schweregrad und der klinischen Symptomatik (ROTH et al. 1990b).

Die eosinophile Gastroenteritis ist die zweithäufigste Form (VAN DER GAAG u. HAPPE 1990). Histologisch fällt eine gemischtzellige Infiltration der Schleimhaut auf, wobei eosinophile Granulozyten dominieren. Unter anderem werden endoparasitäre Antigene als Grund für die Stimulation des intestinalen Immunsystems angesehen (DAY u. HALL 1999).

Eine seltene Form der IBD ist die granulomatöse Enteritis, charakterisiert durch die Infiltration der Schleimhaut mit Makrophagen (BARKER et al. 1993). Sie kommt als

fokale Entzündung im Endbereich des Ileums, im Kolon und in den mesenterialen Lymphknoten vor. Neben der Infiltration mit Makrophagen, Riesenzellen, Neutrophilen, Eosinophilen, Lymphozyten und Plasmazellen fallen Villusatrophie, Kryptenhypertrophie, Ulzerationen sowie Nekroseherde und Fibrose auf. Die mesenterialen Lymphknoten zeigen eine reaktive Hyperplasie mit granulomatösen Herden und Sinushistiozytose (DAY u. HALL 1999).

### **2.8.2 Bakterielle Überbesiedelung des Darmes**

Die bakterielle Überbesiedelung des Dünndarms (Small Intestinal Bacterial Overgrowth – SIBO) beinhaltet eine Vermehrung der Dünndarmbakterien, in erster Linie die anaerobe Bakterienfraktion, mit einer Störung der intestinalen Funktion (BATT et al. 1991). Dieses Syndrom wurde vor allem beim Deutschen Schäferhund beschrieben und ein Zusammenhang mit einem relativen Mangel an Serum-IgA diskutiert (BATT et al. 1991). Selten steht die Überbesiedelung mit anderen Erkrankungen wie verminderter Magensäureproduktion oder exokriner Pankreasinsuffizienz in Verbindung. Meistens ist jedoch keine definitive Ursache zu finden (DAY u. HALL 1999). Die Pathophysiologie ist komplex und beinhaltet intraluminale Effekte der proliferierenden Bakterien und eine direkte Schädigung der Enterozyten selbst (WILLIAMS 2001). Biopsien aus dem Jejunum zeigen eine partielle Villusatrophie und unterschiedlich ausgeprägte Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten (BLAKEMORE 1994). In der Lamina propria wurden vermehrt IgA-Plasmazellen und CD4<sup>+</sup>- Zellen gefunden (siehe schematische Darstellung Tabelle 1) (GERMAN 2001).

### **2.8.3 Futtermittel-Hypersensitivität**

Bei einigen Säugetieren können bestimmte Futterbestandteile eine immunologische Sensibilisierung und nachfolgende Hypersensitivität auslösen. Eine echte Hypersensitivität muss von einer Futtermittelintoleranz unterschieden werden. Die Hypersensitivität beruht auf einer immunologischen Fehlregulation. Eine Futtermittelintoleranz wird durch bestimmte Futterbestandteile, durch pharmakologische oder toxische Wirkung verursacht (DAY u. HALL 1999, GARDEN 2001b). Zumeist zeigen Hunde mit einer Futtermittelintoleranz keine Veränderungen der Immunzellpopulation in der Schleimhaut (siehe schematische Darstellung Tabelle 1) (GERMAN et al. 2001). Aus dieser Studie geht allerdings nicht hervor, ob die Reaktionen auf

Futtermittel bei den Patienten auf einer immunologischen Grundlage oder auf einer Intoleranz basieren. Des Weiteren ist die Größe dieser Patientengruppe sehr klein (GERMAN et al. 2001).

Tab. 1: Schematische Darstellung signifikanter Veränderungen der Zellverteilung bei bestimmten gastrointestinalen Erkrankungen

Lokalisation	Zelltyp	IBD	SIBO	FH
IE	Becherzellen	---	---	---
IE	T-Lymphozyten	>	>	---
IE	T-Helferzellen	---	---	---
IE	T-Suppressorzelle	---	---	---
IE	Eosinophile Granulozyten	---	---	---
LP	Mastzellen	<	---	---
LP	IgG-Plasmazellen	>	---	---
LP	IgA-Plasmazellen	---	>	---
LP	IgM-Plasmazellen	---	---	---
LP	T-Lymphozyten	>	---	---
LP	T-Helferzellen	>	>	---
LP	T-Suppressorzellen	---	---	---
LP	Eosinophile Granulozyten	---	---	---

(IE, intraepithelial; LP, Lamina propria; IBD, inflammatory bowel disease; SIBO, small intestinal bacterial overgrowth; FH, Futtermittel-Hypersensitivität) < signifikant weniger Zellen; > signifikant mehr Zellen; --- kein Unterschied; Darstellung modifiziert nach GERMAN et al. (2001)

#### 2.8.4 Neoplasien des Darmes

Das intestinale maligne Lymphom ist charakterisiert durch die meist diffuse Infiltration der Schleimhaut und Submukosa mit monoklonalen lymphatischen Zellen. Betroffen sind meist mittelalte bis ältere Hunde. Die Diagnose wird anhand der Darstellung von monoklonalen Lymphozyten in Aspiraten oder Biopsaten von vergrößerten Darm- oder peripheren Lymphknoten gestellt, am häufigsten aber durch Darmbiopsien. Obwohl Lymphome in der Regel gut Zellen exfolieren, können endoskopisch gewonnene Biopsien die Läsion verfehlen oder nur Zeichen einer LPE wiedergeben (HALL u. SIMPSON 2000). Eine Unterscheidung kann durch immunhistologische Färbungen gesichert werden. Die lymphozytäre Infiltration bei LPE ist im Gegensatz zum intestinalen Lymphom durch Polyklonalität gekennzeichnet (COUTO et al. 1989).

Viele Lymphozyten sind in basophil gefärbten Mukus eingebettet. Die großen unreifen Lymphozyten haben einen ovalen bis unregelmäßig geformten Kern aus homogenem, blass gefärbtem Chromatin, umgeben von einer geringen bis mäßigen Menge leicht basophilem Zytoplasmas (ANDREASEN et al. 2000).

Intestinale Adenokarzinome sind relativ häufige Tumore im Duodenum des Hundes. Sie wachsen lokal infiltrativ und führen zur partiellen Obstruktion. Die Diagnose wird anhand von Aspirationsbiopsien oder chirurgischen „Full-Thickness“-Biopsien gestellt (HALL u. SIMPSON 2000). Das zytologische Bild entspricht der generellen Charakteristik von Neoplasien des Epithelgewebes (ANDREASEN et al. 2000).

Andere intestinale Neoplasien, wie zum Beispiel Leiomyosarkome, Leiomyome und Fibrosarkome, sind selten und zytologisch schwer zu diagnostizieren.

### **3 TIERE, MATERIAL UND METHODEN**

#### **3.1 Untersuchte Tiere**

Für die zytologische Untersuchung endoskopisch gewonnener Darmbiopsien von gesunden Hunden wurden Hunde ( $n = 26$ ) mit ungestörtem Allgemeinbefinden ohne anamnestische Hinweise gastrointestinaler Erkrankungen unterschiedlicher Rassen und beiderlei Geschlechts aus dem Patientengut der Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig untersucht. Bei diesen Tieren erfolgten Routineeingriffe, wie Kastrationen zur Fortpflanzungsunterbindung, Versorgung von Zahnfrakturen oder Implantatentfernungen. Im Rahmen dieser Narkose wurde die Endoskopie mit dem Einverständnis der Besitzer durchgeführt.

Es wurden drei Altersgruppen gebildet. Die erste Gruppe umfasst junge Hunde mit einem Alter bis zu zwei Jahren ( $n = 9$ ; Mittelwert des Alters = 15,3 Monate,  $x_{\min}$  6 Monate,  $x_{\max}$  22 Monate). Der zweiten Gruppe gehören mittelalte Hunde zwischen zwei und acht Jahren an ( $n=9$ ; Mittelwert des Alters = 4,75 Jahre,  $x_{\min}$  2,25 Jahre,  $x_{\max}$  7,0 Jahre). Und in der dritten Gruppe sind Hunde älter als acht Jahre ( $n = 8$ ; Mittelwert des Alters = 9,5 Jahre,  $x_{\min}$  8 Jahre,  $x_{\max}$  14,25 Jahre) vertreten. Angaben bezüglich Rasse, Geschlecht, Alter und der Art des chirurgischen Eingriffs sind den Tabellen 16 bis 18 im Anhang zu entnehmen.

#### **3.2 Einschluss- und Ausschlusskriterien**

Zur Beurteilung des Gesundheitsstatus wurde eine ausführliche Anamnese hinsichtlich akuter und chronischer gastrointestinaler Symptomatik oder anderer internistischer Erkrankungen, Medikationen und stattgefundenen Unfällen erhoben. Hunde mit gastrointestinaler Symptomatik (Vomitus, Diarrhoe, Inappetenz) innerhalb der letzten vier Monate vor der Untersuchung sowie chronisch rezidivierender Problematik und bekannten Futtermittelunverträglichkeiten wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Ebenso wurden Hunde, die in den letzten zwei Monaten mit Antibiotika, nichtsteroidalen Antiphlogistika oder Glukokortikoiden behandelt wurden, nicht in die Studie mit einbezogen.

Bei jedem Patienten wurde eine hämatologische Untersuchung mit einem Blutbild inklusive einer manuellen Differenzierung sowie der Bestimmung einzelner blut-chemischer Parameter eingeleitet (Harnstoff, Kreatinin, Glukose, Cholesterin,

Gesamteiweiß, Albumin, Globulin, Natrium, Kalium, Kalzium, Alaninaminotransferase, alkalische Phosphatase, Amylase und Lipase). Die hämatologische Untersuchung erfolgte mit dem Vet abc<sup>2</sup>. Die Bestimmung der klinisch-chemischen Parameter wurde in der Medizinischen Tierklinik der Universität Leipzig am HITACHI 704<sup>3</sup> durchgeführt; die Enzymaktivitäten wurden bei 37°C gemessen. Abweichungen von den Referenzwerten führten zum Ausschluss des Patienten.

Um parasitäre Erkrankungen auszuschließen, wurde der Kot hinsichtlich des Vorhandenseins von Parasiten und deren Entwicklungsstadien mikroskopisch mit einem Flotationsverfahren untersucht. Der Nachweis von Giardia-Antigen erfolgte durch ein spezielles ELISA über den Kot<sup>4</sup>. Die parasitologische Kotuntersuchung im Flotationsverfahren wurde im Institut für Parasitologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig durchgeführt. Der Antigen-Nachweis mittels ELISA wurde von dem Labor Laboklin, Bad Kissingen, erstellt. Patienten mit einem Nachweis von Parasiten oder deren Entwicklungsstadien oder mit einem positiven ELISA-Test für Giardia-Antigen wurden von der Studie ausgeschlossen.

Um schwerwiegende Dysbakterien auszuschließen, wurde zusätzlich von jedem Patienten eine aerobe und anaerobe bakteriologische Kotuntersuchung eingeleitet. Diese Untersuchung fand im Institut für Mikrobakteriologie der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig statt. Hunde mit obligat pathogenen Darmkeimen wurden von der Untersuchung ausgeschlossen.

### **3.3 Probengewinnung**

Die endoskopische Probengewinnung erfolgte unter Allgemeinanästhesie im Rahmen von geplanten Routineeingriffen, wie zum Beispiel einer Kastration oder Implantatentfernung.

Zur Vorbereitung des Patienten erfolgte ein mindestens zwölfständiger Futterentzug. Die Allgemeinanästhesie wurde unter Verwendung von 0,5-1,0 mg/kg Körpermasse Diazepam<sup>5</sup>, 0,02-0,05 mg/kg Körpermasse Atropin<sup>6</sup>, 3,0 mg/kg Körpermasse

---

<sup>2</sup> Vet abc Animal Blood Counter, Firma Scil Animal Care Company, Viernhei

<sup>3</sup> HITACHI 704, Firma Boehringer Mannheim

<sup>4</sup> RIDASCREEN® Giardia (C1101), Firma R-Biopharm AG, Darmstadt

<sup>5</sup> Faustan Injektionslösung®, Temmler Pharma GmbH und Co. KG, Marburg

<sup>6</sup> Atropinsulfat B. Braun 0,5 mg/ml Injektionslösung, B. Braun Melsungen AG, Melsungen



Ketamin<sup>7</sup>, 0,3 mg/kg Körpermasse Xylazin<sup>8</sup> intravenös eingeleitet und durch eine Inhalationsnarkose mit Isofluran<sup>9</sup> aufrechterhalten und die Narkosetiefe und -dauer gesteuert.

Zur Untersuchung kamen Abklatschpräparate von endoskopisch gewonnenen Schleimhautbiopsien aus dem Duodenum. Mit einem flexiblen Videoendoskop<sup>10</sup> und einer Forceps-Zange mit Zentralsporn mit einem Durchmesser von 2,5 mm konnten die Proben an vier verschiedenen Stellen aus dem Duodenum gewonnen werden. Jedes Biopat wurde mindestens zehnmal nacheinander der Reihe nach auf einem Objektträger mit mäßigem Druck aufgedrückt. Dabei sollte der Druck möglichst senkrecht einwirken. Die Färbung der gesammelten luftgetrockneten Präparate erfolgte nach May-Grünwald-Giemsa mit Hilfe eines Färbeautomaten<sup>11</sup>. Pro Patient wurden mindestens acht Objektträger aus dem Darmbereich makro- und mikroskopisch durchgemustert und ausgewertet.

### **3.4 Methoden**

Makroskopisch unbrauchbare Präparate wurden aussortiert. Die Präparate wurden mit dem Mikroskop Axioskop 20<sup>12</sup> ausgewertet. Die Messung der Zellgröße erfolgte mit einem Strichkreuzmikrometer. Dabei wurde das Mikrometer so eingestellt, dass ein Teilstrich in der 1000er Vergrößerung 1 µm entsprach.

Alle Daten wurden visuell mikroskopisch erhoben. Es wurden sowohl Messungen von Zellkomponenten als auch semiquantitative Untersuchungen durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte systematisch nach folgendem von den Untersuchern entworfenen Untersuchungsschema.

Die allgemeinen Qualitätsmerkmale unter Punkt 3.4.1. wurden in der 100er- und 400er-Vergrößerung bearbeitet. Die Auszählung und Größenzuordnung der vorhandenen Zellpopulation unter Punkt 3.4.2. erfolgte mit der 630er-Vergrößerung (1 Teilstrich des Strichkreuzmikrometers entspricht 1,5 µm). Die allgemeinen und speziellen Zellkriterien unter 3.4.3. wurden mit Ölimmersion in der 1000er-Vergrößerung beurteilt.

---

<sup>7</sup> Ketavet® 100 mg/ml, Firma Pfizer Pharmacia GmbH, Karlsruhe

<sup>8</sup> Xylazin® 2% , Firma A. albrecht GmbH und Co. KG, Aulendorf

<sup>9</sup> Isofluran-Baxter®, Firma Baxter Deutschland GmbH, Unterschleißheim

<sup>10</sup> Firma ETM Germany, PV-G 30, Durchmesser 12 mm

<sup>11</sup> CHROMATIC-MINOR 5 Bad-Ausführung, PSI Medizintechnik, Grünwald

<sup>12</sup> Axioskop 20, Firma Carl Zeiss, Jena

### **3.4.1 Allgemeine Qualitätsmerkmale**

#### **3.4.1.1 Qualität des Präparates**

Die Qualität des Präparates wurde mit 0 = nicht auswertbar, 1 = auswertbar, 2 = gut auswertbar beurteilt. Beginnend mit einer kleinen Vergrößerung (20x) wurde zunächst das gesamte Präparat durchgemustert, um unregelmäßig gefärbte Areale bzw. Areale mit vermehrter Zellularität zu erkennen.

#### **3.4.1.2 „Monolayer“**

Unter diesem Punkt wurde das Verhältnis von gut auswertbaren Monolayern zu schlecht auswertbaren mehrschichtigen Zellhaufen beurteilt. Da nur Areale später ausgezählt werden können, in denen die Zellen überwiegend als Monolayer vorliegen, soll diese Einschätzung als zusätzliches Qualitätsmerkmal dienen. Die Einteilung erfolgte mit 0 = keine Monolayer, 1 = vereinzelt Monolayer, 2 = gleiche Anteile Monolayer und mehrschichtige Zellhaufen, 3 = überwiegend Monolayer.

#### **3.4.1.3 Freies Kernprotein**

Freies Kernprotein durch Zellzerstörung bei der Herstellung der Abklatschpräparate ist ebenfalls Ausdruck der Qualität des Präparates. Die Einschätzung erfolgte mit 0 = kein freies Kernprotein, 1 = geringgradiger Gehalt an freiem Kernprotein, 2 = mittelgradiger Gehalt an freiem Kernprotein und 3 = hochgradiger Gehalt an freiem Kernprotein. Als geringgradiger Gehalt galten vereinzelt in den Randgebieten vorkommende zerstörte Zellen. Mittelgradig, wenn sich auch zwischen den auszu-zählenden Arealen, Gebiete mit vorwiegend nicht mehr intakten Zellkernen befanden. Ein hochgradiger Gehalt an freiem Kernprotein lag vor, wenn das Präparat überwiegend aus nicht mehr auswertbaren Zellen bestand.

#### **3.4.1.4 Zellularität**

Für eine gute Auswertung ist eine ausreichende Zellularität essentiell. Gerade bei Biopsien aus dem Magen-Darm-Kanal vermindert anhaftender Schleim die Zelladhärenz auf dem Objektträger und führt oft zu Präparaten mit nur wenig Zellmaterial. Zur Auszählung wurden nur Zellverbände herangezogen, die mindestens eine Anzahl von 100 auswertbaren Zellen im Monolayer umfassen. Der

Zellgehalt eines Präparates wurde mit 0 = weniger als fünf Zellverbände, 1 = fünf bis neun Zellverbände und 2 = zehn Zellverbände und mehr, eingeteilt.

#### **3.4.1.5 Blutkontamination**

Durch eine Blutkontamination bei der Probengewinnung und der damit verbundenen artifiziell erhöhten Anzahl an Zellen des roten und weißen Blutbildes im Präparat, kann ein entzündliches Geschehen vorgetäuscht werden. Der Gehalt an Erythrozyten, somit der Grad der Blutkontamination wurde erfasst und mit 0 = keine Blutkontamination bzw. keine Erythrozyten, 1 = vereinzelte Erythrozyten, vor allem in den Randgebieten eines Clusters, 2 = „Erythrozyten-Nester“, das heißt größere Erythrozytenkonzentrationen zwischen einzelnen Clustern, 3 = vordergründig nur Erythrozyten, beschrieben.

#### **3.4.1.6 Bakterien**

Der Gehalt an Bakterien im Präparat wurde mit 0 = keine Bakterien, 1 = geringgradiger Gehalt, entsprechend vereinzelte Bakterien im Bereich der Zellverbände, 2 = mittelgradiger Gehalt, vereinzelte „Bakteriennester“, und 3 = hochgradiger Gehalt, Bakterienansammlungen in den meisten Gesichtsfeldern, beschrieben. Zusätzlich wurde die Art der vorkommenden Bakterien, insbesondere Bakterien aus der Maul- und Rachenhöhle, zum Beispiel *Simonsiella*, *Helicobacter*-ähnliche Organismen sowie Stäbchen und Kokken aus dem Darm beschrieben.

#### **3.4.1.7 Parasiten**

Das Vorkommen von Parasiten und deren Entwicklungsstadien, insbesondere das Vorhandensein von *Giardia* spp. wurde mit 0 = keine Parasiten oder 1 = Parasiten vorhanden, beschrieben.

#### **3.4.1.8 Debris und Ingesta**

Enthielt das Präparat Debris und Ingesta (Pflanzenteile oder andere pigmentierte Partikel), wurde das mit 0 = kein Fremdmaterial, 1 = geringgradiger Gehalt an Fremdmaterial am Objektträgerrand, 2 = mittelgradiger Gehalt an Fremdmaterial, vereinzelt zwischen den Clustern, und 3 = hochgradiger Gehalt an Fremdmaterial, in fast jedem Gesichtsfeld sichtbar, bewertet.

#### **3.4.1.9 Plattenepithelien**

Das Vorkommen von Plattenepithelien ist Ausdruck einer Kontamination aus dem oberen Verdauungstrakt. 0 = keine Plattenepithelien im Präparat, 1 = vereinzelte Plattenepithelzellen, weniger als zehn Zellen im Präparat, 2 = mittelgradiger Gehalt an Plattenepithelzellen, einzelne Zellen, aber mehr als zehn im Präparat, 3 = hochgradiger Gehalt, Plattenepithelverbände im Präparat.

#### **3.4.2 Zählung und Verteilung der Zellpopulationen**

Für die Bestimmung der Zellpopulation wurde je Präparat möglichst zehn gut auswertbare Gesichtsfelder mit Verbänden von mindestens 100 Zellen durchgemustert und ausgezählt. Die Zählung beschränkte sich dabei nicht nur auf das jeweilige Gesichtsfeld, sondern umfasste den gesamten Zellverband. In jedem Verband wurden die Epithelzellen und die vorhandenen Entzündungszellen gezählt und differenziert. Ebenso wurde die Anordnung der Entzündungszellen im Bezug zu den Epithelzellen beschrieben; dabei gilt 0 = nicht vorhanden, 1 = diffuse Anordnung um und im Verband, 2 = eine Zelllage bzw. einzelne Entzündungszellen um einen Verband herum, 3 = Entzündungszellen liegen in zwei Zelllagen um einen Verband, 4 = drei Zelllagen, 5 = herdförmige Ansammlung oder einzeln liegend unabhängig von den Epithelzellen.

Bei den Epithelzellen wurden Enterozyten und sezernierende Enterozyten, entsprechend Becherzellen, unterschieden. Die Entzündungszellen wurden eingeteilt in kleine dunkle Lymphozyten, kleine helle Lymphozyten, mittelgroße helle Lymphozyten, große helle Lymphozyten, große granulierte Lymphozyten, Lymphoblasten, eosinophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten, Mastzellen und Plasmazellen.

#### **3.4.3 Zytologische Zellkriterien**

Um die Mitoserate zu ermitteln wurde die Anzahl der vorkommenden Mitosen bei 100 Enterozyten bestimmt und als Prozentzahl angegeben.

Die Anzahl der Kerne pro Zelle, ausgezählt an 100 Enterozyten wurde mit 1 = ein Kern pro Zelle, 2 = bis 10% mehrkernige Zellen angegeben.

Die Chromatinstruktur wurde mit 0 = fein granulär, 1 = grob granulär, 2 = fein verklumpt, 3 = stark verklumpt, 4 = kondensiert, differenziert.

Das Vorkommen von Kernmembranverdickungen wurde mit 0 = keine, 1 = < 20%, 2 = > 20% der Kerne mit Kernmembranverdickungen, an 100 gezählten Zellen beurteilt.

Die Kernfarbe wurde beschrieben als 1 = pink, 2 = hellblau, 3 = dunkelblau, 4 = violett.

Die Deutlichkeit der Nukleoli wurde mit 0 = kaum erkennbar, 1 = erkennbar, 2 = deutlich erkennbar bewertet.

Die Zahl der Nukleoli pro Kern wurde als Mittelwert von an 100 Enterozyten ausgezählten Nukleoli angegeben.

Die Farbe der Nukleoli wurde mit 1 = grau, 2 = rot, 3 = hellblau und 4 = dunkelblau beschrieben.

Die Form der Nukleoli wurde mit 1 = überwiegend rund und 2 = überwiegend eckig unterschieden.

Die Deutlichkeit der Zellgrenzen wurde in 0 = Zellgrenzen nicht zu erkennen, 1 = Zellgrenzen undeutlich, 2 = Zellgrenzen deutlich eingeteilt.

Die Farbe des Zytoplasmas wurde mit 0 = blass, 1 = hellblau, 2 = mittelblau und 3 = dunkelblau beschrieben.

Das Vorkommen von Vakuolen im Zytoplasma wurde mit 0 = keine Vakuolen erkennbar, 1 = wenig Vakuolen erkennbar und 2 = viele Vakuolen erkennbar, beschrieben.

Abschließend wurde das Vorkommen von Malignitätskriterien geprüft und einzeln aufgeführt. Unterschieden wurden: Anisozytose, Anisokaryose, eckige Nukleoli, Makronukleoli, Makronuklei, Anisonukleose, Kernmembranverdickung, "Nuclear molding", atypische Mitosen, mehrkernige Riesenzellen, Kerndeformation, Kerneinbuchtung, Chromatinverklumpung sowie zytoplasmatische Basophilie. Die Befundung erfolgte mit 0 = nicht vorhanden und 1 = vorhanden.

### **3.5 Biostatistische Methoden**

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm SPSS für Windows, Version 12.0 (Chicago Inc., USA) vorgenommen. Alle Parameter wurden zunächst mit der deskriptiven Statistik bearbeitet, um daran die Qualitätsmerkmale, die Referenzbereiche und die Zellkriterien zu beurteilen. Für die Beurteilung der Altersunterschiede bezüglich der Verteilung der Entzündungszellen wurden diese zunächst auf Homogenität der Varianzen mit dem einfaktoriellen ANOVA-Programm (Analysis of Variance) getestet. Bei bestehender Homogenität wurde Signifikanz der Gruppenunterschiede mit dem Tukey-HSD-Test geprüft. Für nicht normalverteilte Untersuchungsparameter wurde mit dem Kruskal-Wallis-Test auf signifikante Mittelwertdifferenzen zwischen den Gruppen geprüft und der Gruppenvergleich mit dem Mann-Whitney-Test verdeutlicht. Das deskriptive Signifikanzniveau wurde mit  $p < 0,05$  festgelegt. Für die Referenzbereiche wurde das 95%-Konfidenzintervall mit der Ober- und Untergrenze aus der deskriptiven Statistik herangezogen.

## **4 ERGEBNISSE**

### **4.1 Endoskopische Befunde von Ösophagus, Magen und Duodenum**

Die Schleimhaut des Ösophagus bei gesunden Hunden war zartrosa und glatt. Im Bereich des gastroösophagealen Übergangs zeigte sich eine leichte Rötung der Schleimhaut. Submuköse Gefäße waren nicht sichtbar. Die Wand erschien am anästhesierten Tier schlaff und über den großen thorakalen Gefäßen legte sie sich in Falten.

Beim Eintritt des Endoskopes in den Magen, lag dieser in Falten vor. Durch Insufflation von Luft verstrichen diese Falten vollständig. Die normale Magenschleimhaut war leuchtend pink bis rötlich, im Bereich des Pylorus erschien sie etwas heller. Submuköse Gefäße waren nicht sichtbar, außer im Bereich der Kardie unter starker Insufflation. Die Incisura angularis blieb als prominente Falte bestehen und diente als Orientierungspunkt. Der Pylorus konnte unterschiedlich geformt sein, üblicherweise zeigte sich ein rhythmisches Öffnen und Schließen. Eventuell war ein leichter gastroduodenaler Reflux erkennbar.

Die Darmschleimhaut im Duodenum erschien pink bis leicht violett. Die Oberfläche wirkte etwas körniger und bröckeliger, als die Magenschleimhaut. Unter Umständen konnten die einzelnen Villi erkannt werden. Durch die Manipulation mit dem Endoskop kam es schnell zu Veränderungen im Bereich der Schleimhaut, inklusive oberflächlichen Blutungen und Abrasionen. In einigen Fällen konnten Peyer'sche Plaques als Einziehung erkannt werden.

### **4.2 Allgemeine Kriterien**

#### **4.2.1 Qualität der Präparate**

Die Präparate waren alle von auswertbarer bis gut auswertbarer Qualität, wobei mehr Präparate als gut auswertbar beurteilt wurden (siehe Tab. 2). Mit der kleinen Vergrößerung (200er) erschienen die Präparate von ausreichendem Zellgehalt und regelmäßig gefärbt.

#### **4.2.2 „Monolayer“**

Es wurden Präparate ausgewertet mit vereinzelt Monolayern. Der überwiegende Teil der Präparate zeichnete sich allerdings durch ein ausgewogenes Verhältnis von Monolayern zu mehrschichtigen Zellverbänden aus (siehe Tab. 2). Einen nur geringeren Anteil nehmen Präparate ein, die einen überwiegenden Gehalt von Monolayern aufweisen.

#### **4.2.3 Freies Kernprotein**

Freies Kernprotein war in allen Präparaten vorhanden. In den meisten Präparaten wurde der Gehalt als mittelgradig eingestuft (siehe Tab. 2).

#### **4.2.4 Zellularität**

Die Zellularität war in allen Präparaten ausreichend. Es wurden hauptsächlich Präparate mit mehr als zehn Zellverbänden mit über 100 Zellen ausgewertet (siehe Tab. 2). Ein geringer Teil der Präparate enthielt weniger als zehn Zellverbände mit mehr als 100 Zellen.

#### **4.2.5 Blutkontamination**

Eine geringgradige Blutkontamination mit vereinzelt Erythrozyten wurde in allen Präparaten gefunden (siehe Tab. 2). In wenigen Fällen wurden Nester, d.h. größere Ansammlungen von Erythrozyten befundet. In keinem Präparat lag eine hochgradige Kontamination vor.

#### **4.2.6 Bakterien**

Es waren bei den meisten Patienten keine Bakterien in den Präparaten vorhanden (siehe Tab. 2). Bei Patient Nr. 1 konnten wenige Helicobacter-ähnliche Organismen gefunden werden, als Ausdruck einer Kontamination aus dem Magen. Bei Patient Nr. 13 wurden vereinzelt Helicobacter-ähnliche Organismen und Kokken in den Präparaten gesehen.



#### 4.2.7 Parasiten

Es wurde bei keinem Patienten Parasiten oder deren Entwicklungsstadien gefunden (siehe Tab. 2).

#### 4.2.8 Debris und Ingesta

Ein geringgradiger Gehalt an Debris und Ingesta war in allen Präparaten zu verzeichnen. In geringerem Umfang konnte der Grad der Kontamination als mittelgradig beurteilt werden (siehe Tab. 2). Eine hochgradige Kontamination wurde jedoch nicht beobachtet.

#### 4.2.9 Plattenepithelien

In einem geringen Anteil der Präparate wurde eine geringgradige Kontamination mit Plattenepithelien aus dem oberen Verdauungstrakt beobachtet (siehe Tab. 2). Der überwiegende Anteil war ohne eine Kontamination.

Tab. 2: Tabellarische Übersicht der Mittelwerte der allgemeinen Kriterien

	n	$\bar{x}$	s	$X_{\min}$	$X_{\max}$
<b>Qualität</b>	26	1,63	0,48	1	2
<b>Monolayer</b>	26	2,36	0,63	1	3
<b>Freies Kernprotein</b>	26	1,65	0,54	1	3
<b>Zellularität</b>	26	1,88	0,29	1	2
<b>Blutkontamination</b>	26	1,44	0,27	1	2
<b>Bakterien</b>	26	0,09	0,19	0	1
<b>Parasiten</b>	26	0	0	0	0
<b>Debris/Ingesta</b>	26	1,27	0,32	1	2
<b>Plattenepithelien</b>	26	0,31	0,37	0	1

Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) mit der Standardabweichung (s) sowie die Minima und Maxima des Bewertungsschemas

#### 4.3 Zählung und Verteilung der einzelnen Zellpopulationen

Die tabellarische Darstellung der Ergebnisse von der Zählung der vorkommenden Zellen erfolgt in Tabelle 3 (Absolutwerte) beziehungsweise Tabelle 4 (Prozent).

Für die Ermittlung der Gesamtzellzahl pro Objektträger (Total) wurden pro Objektträger in zehn Gesichtsfeldern 2119 einzelne Zellen ausgezählt. Minimal im Mittel

1404, maximal 3009 Zellen. Die Zellen stellten vorwiegend Enterozyten, daneben die entsprechenden Entzündungszellen dar. Die Gesamtzellzahl entspricht 100%.

Von den insgesamt gezählten Zellen sind im Mittel 93% den Enterozyten zu zuordnen (siehe Abb. 11). Die sezernierenden Enterozyten nahmen nur einen geringen mittleren Prozentanteil von 0,85% von der Gesamtpopulation ein.

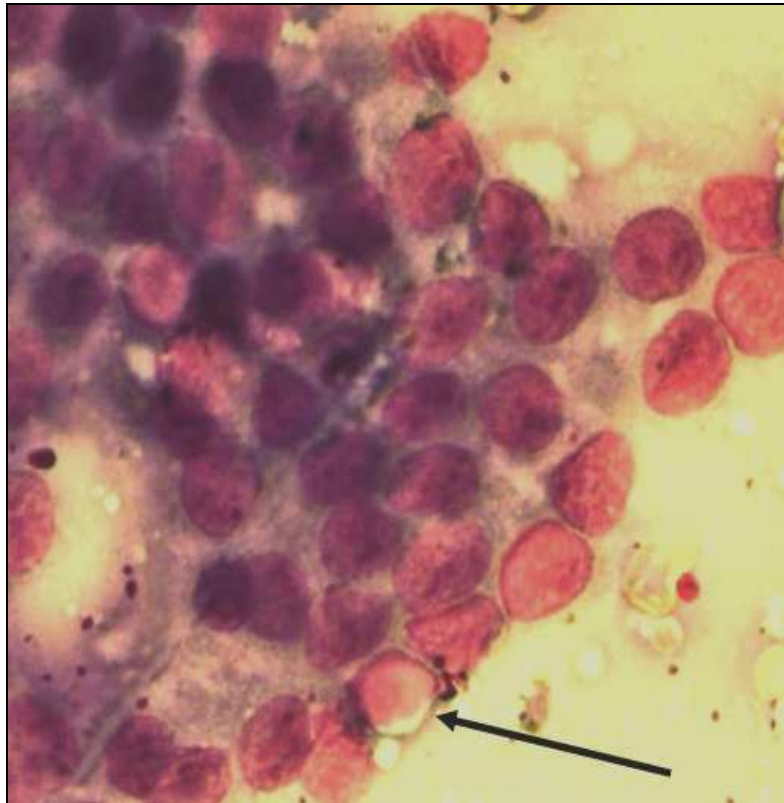


Abb. 11: Enterozytenverband mit einem hellen Lymphozyten (Pfeil) (63x)

Die kleinen dunklen Lymphozyten waren neben den mittleren hellen Lymphozyten mit 2,3% die häufigsten Entzündungszellen. Die kleinen hellen Lymphozyten waren zu einem geringeren mittleren Anteil mit 1,1% vertreten. Die mittleren hellen Lymphozyten nahmen mit einem Mittelwert von 2,45% den größten Anteil der Entzündungszellen ein (siehe Abb. 12).

Einen kleinen mittleren Anteil von 0,2% (im Mittel vier Zellen absolut) bildeten die großen hellen Lymphozyten. Hier trat ein Altersunterschied auf (siehe Kapitel 4.7). Es waren keine Lymphoblasten vorhanden. Einen sehr geringen mittleren Anteil bildeten die großen granulierten Lymphozyten (siehe Abb. 13) mit 0,06%. Auch bei dieser Zellart gab es einen Altersunterschied (siehe Kapitel 4.7).

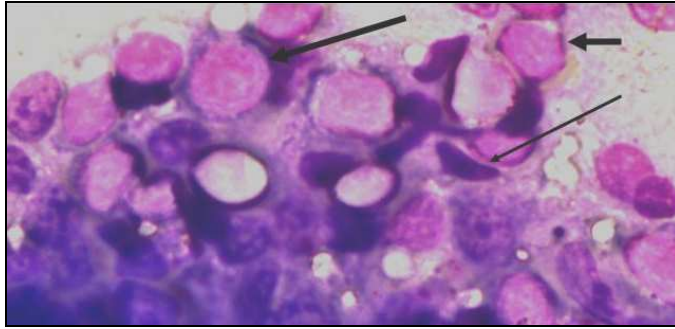


Abb. 12: Ansammlung unterschiedlicher Lymphozyten: kleine (kurzer dicker Pfeil) und mittelgroße (langer dicker Pfeil) helle Lymphozyten sowie kleine dunkle Lymphozyten (dünner Pfeil) (63x)

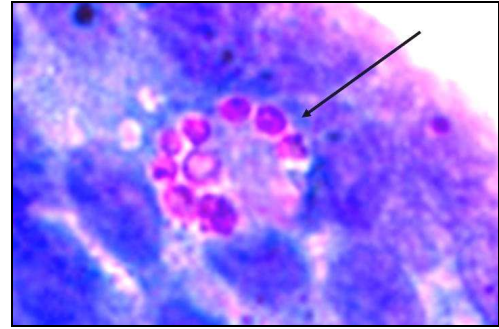


Abb. 13: großer granulierter Lymphozyt (dicker Pfeil) zwischen Enterozyten (63x)

Sehr unregelmäßig und nur in wenigen Präparaten konnten Neutrophile Granulozyten entdeckt werden (Mittelwert 0,02%). Etwas häufiger als die Neutrophilen Granulozyten waren Eosinophile Granulozyten (Mittelwert 0,05%) vertreten.

Plasmazellen (siehe Abb. 14) waren, ähnlich wie die Neutrophilen und Eosinophilen Granulozyten, nicht in allen Präparaten vorhanden (Mittelwert 0,02%).

Häufiger als Plasmazellen konnten Mastzellen (siehe Abb. 15) gezählt werden (Mittelwert 0,03%).

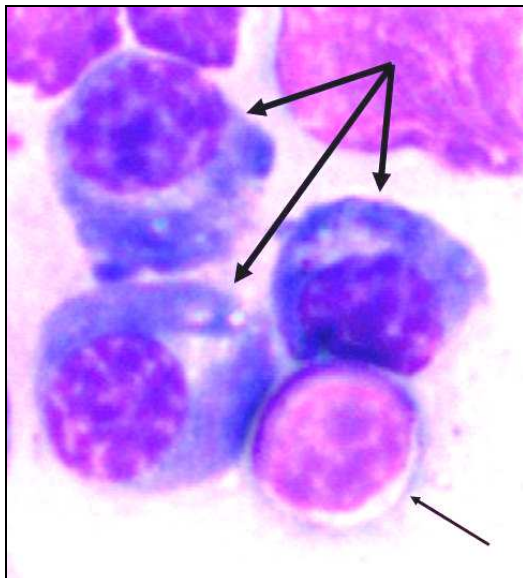


Abb. 14: Drei Plasmazellen (dicke Pfeile) und ein heller Lymphozyt (dünner Pfeil) ohne Kontakt zu Enterozyten (63x)

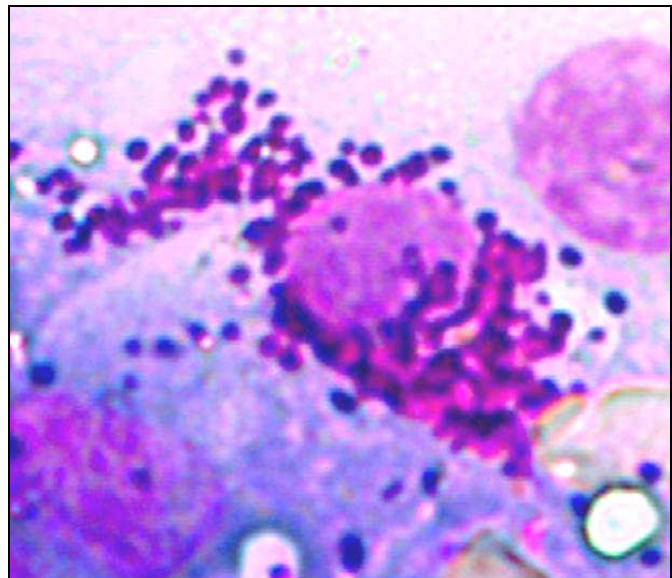


Abb. 15: Mastzelle ohne Kontakt zu Enterozyten (63x)

Tab. 3: Übersicht der Mittelwerte der Absolutzahlen der einzelnen Zellpopulationen

	<b>n</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>s</b>	<b><math>X_{\min}</math></b>	<b><math>X_{\max}</math></b>
<b>Gesamtzellzahl</b>	26	2118,92	408,35	1404	3009,5
<b>Enterozyten</b>	26	1967,27	371,53	1350	2719,5
<b>sezernierende Enterozyten</b>	26	19,23	15,81	3,25	53,5
<b>kleine dunkle Lymphozyten</b>	26	49,87	32,95	1	146,25
<b>kleine helle Lymphozyten</b>	26	22,23	20,85	1,75	77,25
<b>mittlere helle Lymphozyten</b>	26	52,38	32	1	149,25
<b>große helle Lymphozyten</b>	26	4,43	2,92	0	10
<b>Lymphoblasten</b>	26	0	0	0	0
<b>große granulierte Lymphozyten</b>	26	1,2	1,68	0	5,75
<b>neutrophile Granulozyten</b>	26	0,41	0,94	0	3,25
<b>eosinophile Granulozyten</b>	26	0,97	1,89	0	7,5
<b>Plasmazellen</b>	26	0,35	0,54	0	2,25
<b>Mastzellen</b>	26	0,55	0,54	0	1,75

Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der pro Objektträger als Absolutzahlen gezählten Zellen mit der Standardabweichung (s) sowie die Minima und Maxima.

Tab. 4: Übersicht der Mittelwerte der prozentualen Verteilung der einzelnen Zellpopulationen

	<b>n</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>s</b>	<b><math>X_{\min}</math></b>	<b><math>X_{\max}</math></b>
<b>Gesamtzellzahl</b>	26	100%			
<b>Enterozyten</b>	26	93,08	2,86	85,44	97,01
<b>sezernierende Enterozyten</b>	26	0,85	0,57	0,13	2,1
<b>kleine dunkle Lymphozyten</b>	26	2,27	1,4	0,06	6,91
<b>kleine helle Lymphozyten</b>	26	1,09	1,1	0,09	3,72
<b>mittlere helle Lymphozyten</b>	26	2,45	1,49	0,08	7,18
<b>große helle Lymphozyten</b>	26	0,2	0,14	0	0,55
<b>Lymphoblasten</b>	26	0	0	0	0
<b>große granulierte Lymphozyten</b>	26	0,066	0,11	0	0,35
<b>neutrophile Granulozyten</b>	26	0,02	0,04	0	0,14
<b>eosinophile Granulozyten</b>	26	0,05	0,11	0	0,49
<b>Plasmazellen</b>	26	0,02	0,03	0	0,1
<b>Mastzellen</b>	26	0,03	0,03	0	0,11

Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der prozentualen Anteile der Zellpopulationen an der Gesamtzellzahl (100%) mit der Standardabweichung (s) sowie Minima und Maxima

#### 4.4 Anordnung der Entzündungszellen

Dunkle Lymphozyten waren überwiegend zwischen den Epithelzellen zu finden, während sich helle Lymphozyten vorwiegend einzeln oder in einer Zellschicht außen um einen Epithelverband anlagern (siehe Abb. 11 und 12). Ähnlich wie dunkle Lymphozyten lagen große granulierte Lymphozyten meistens zwischen den Epithelzellen (siehe Abb. 13). Die Granulozyten, Plasmazellen und Mastzellen hingegen lagen vorwiegend unabhängig von den Epithelzellen als Einzelzelle außerhalb eines Zellverbands (siehe Abb. 14 und 15). Die tabellarische Darstellung erfolgt in Tabelle 5.

Tab. 5: Übersicht über die Mittelwerte der Anordnung der Entzündungszellen

	<b>n</b>	<b><math>\bar{x}</math></b>	<b>s</b>	<b><math>X_{\min}</math></b>	<b><math>X_{\max}</math></b>
<b>dunkle Lymphozyten</b>	26	1,23	0,429	1	2
<b>helle Lymphozyten</b>	26	2,07	0,378	1,3	3
<b>große granulierte Lymphozyten</b>	26	0,69	0,471	0	1
<b>andere Entzündungszellen</b>	26	4,62	1,359	0	5

Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) für die Anordnung der Entzündungszellen in Bezug zum Darmepithel mit der Standardabweichung (s) sowie Minima und Maxima.

#### 4.5 Zytologische Zellkriterien der Enterozyten

Die tabellarische Darstellung der Ergebnisse von der Beurteilung der zytologischen Zellkriterien erfolgt in Tabelle 6.

- Das Vorkommen von Mitosen wurde anhand von 100 Zellen beurteilt. Es konnte in keinem Präparat eine Mitose entdeckt werden.
- Es konnten keine mehrkernigen Enterozyten gefunden werden. Die Enterozyten hatten ausnahmslos nur einen Zellkern.
- Die Chromatinstruktur war meist feingranuliert bis granuliert.
- Weniger als 20% der Kerne zeigten eine Kernmembranverdickung.
- Die Kernfarbe der Enterozyten stellte sich in dunkelblauer bis violetter Färbung dar.
- Die Kernkörperchen waren meist sichtbar, selten allerdings deutlich sichtbar.

- Pro Kern war mindestens ein Kernkörperchen vorhanden, in wenigen Zellkernen waren auch zwei sichtbar.
- In der Regel war die Farbe der Kernkörperchen dunkelblau, selten kamen auch hellblaue vor.
- Die Form der Kernkörperchen war überwiegend rund, in einigen Präparaten waren aber auch vermehrt eckige sichtbar.
- Die Zellgrenzen waren überwiegend nicht erkennbar oder nur vage zu erahnen.
- Das Zytoplasma der Enterozyten war mittelblau.
- Es waren keine oder nur wenige Vakuolen im Zytoplasma der Enterozyten vorhanden. Ausgenommen hiervon die sezernierenden Enterozyten.
- Es wurden sowohl eckige Kernkörperchen als auch Kernmembranverdickungen befundet. Andere Malignitätskriterien waren nicht vorhanden.

Tab. 6: Tabellarische Übersicht der Mittelwerte der zytologischen Zellkriterien

	<b>n</b>	$\bar{x}$	<b>s</b>	<b>X<sub>min</sub></b>	<b>X<sub>max</sub></b>
<b>Mitosen je 100 Zellen</b>	26	0	0	0	0
<b>Kerne pro Zelle</b>	26	1	0	1	1
<b>Chromatinstruktur</b>	26	1,47	0,37	1	2
<b>Kernmembranverdickung</b>	26	1,09	0,32	0	2
<b>Kernfarbe</b>	26	3,87	0,26	3	4
<b>Deutlichkeit der Nukleoli</b>	26	0,71	0,49	0	2
<b>Nukleoli pro Kern</b>	26	1,33	0,4	0	2
<b>Farbe der Nukleoli</b>	26	3,97	0,15	3	4
<b>Form der Nukleoli</b>	26	1,23	0,31	1	2
<b>Deutlichkeit der Zellgrenzen</b>	26	0,001	0,05	0	0
<b>Farbe des Zytoplasmas</b>	26	2	0,07	2	2
<b>Vakuolen im Zytoplasma</b>	26	0,87	0,26	0	1

Darstellung der Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) der zytologischen Zellkriterien mit der Standardabweichung (s) sowie der Minima und Maxima.

#### 4.6 Referenzbereiche

Die Absolutzahlen der Entzündungszellen beziehen sich auf die in zehn Gesichtsfeldern pro Objektträger gezählten Zellen. Die Prozentangabe stellt den Bezug zu

den insgesamt gezählten Zellen in zehn Gesichtsfeldern pro Objektträgern dar. In tabellarischer Form werden die Absolutwerte in Tabelle 8 beziehungsweise die Prozentualwerte in Tabelle 9.

Tab. 8: Übersicht der Referenzbereiche für die Absolutwerte

	$X_{\min}$	$X_{\max}$	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
			Untergrenze	Obergrenze
<b>Enterozyten</b>	1350	2719,5	<b>1817,2</b>	<b>2117,33</b>
<b>sezernierende Enterozyten</b>	3,25	53,5	<b>12,85</b>	<b>25,62</b>
<b>kleine dunkle Lymphozyten</b>	1	146	<b>36,55</b>	<b>63,18</b>
<b>kleine helle Lymphozyten</b>	2	77	<b>13,81</b>	<b>30,65</b>
<b>mittlere helle Lymphozyten</b>	1	149	<b>39,46</b>	<b>65,31</b>
<b>große helle Lymphozyten</b>	0	10	<b>3,25</b>	<b>5,61</b>
<b>Lymphoblasten</b>	0	0	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>große granulierte Lymphozyten</b>	0	6	<b>0,52</b>	<b>1,87</b>
<b>neutrophile Granulozyten</b>	0	3	<b>0,03</b>	<b>0,79</b>
<b>eosinophile Granulozyten</b>	0	7	<b>0,21</b>	<b>1,74</b>
<b>Plasmazellen</b>	0	2	<b>0,13</b>	<b>0,57</b>
<b>Mastzellen</b>	0	2	<b>0,33</b>	<b>0,77</b>

Tab. 9: Übersicht der Referenzbereiche für die Prozentwerte

	$X_{\min}$	$X_{\max}$	95%-Konfidenzintervall für den Mittelwert	
			Untergrenze	Obergrenze
<b>Enterozyten</b>	85,44	97,01	<b>91,92</b>	<b>94,23</b>
<b>sezernierende Enterozyten</b>	0,13	2,1	<b>0,62</b>	<b>1,08</b>
<b>kleine dunkle Lymphozyten</b>	0,6	6,9	<b>1,71</b>	<b>2,84</b>
<b>kleine helle Lymphozyten</b>	0,09	3,72	<b>0,64</b>	<b>1,53</b>
<b>mittlere helle Lymphozyten</b>	0,08	7,18	<b>1,85</b>	<b>3,05</b>
<b>große helle Lymphozyten</b>	0	0,55	<b>0,14</b>	<b>0,26</b>
<b>Lymphoblasten</b>	0	0	<b>0</b>	<b>0</b>
<b>große granulierte Lymphozyten</b>	0	0,35	<b>0,02</b>	<b>0,11</b>
<b>neutrophile Granulozyten</b>	0	0,14	<b>0,002</b>	<b>0,03</b>
<b>eosinophile Granulozyten</b>	0	0,49	<b>0,006</b>	<b>0,09</b>
<b>Plasmazellen</b>	0	0,1	<b>0,006</b>	<b>0,03</b>
<b>Mastzellen</b>	0	0,11	<b>0,01</b>	<b>0,04</b>

#### 4.7 Altersgruppenvergleich

Bei kleinen dunklen Lymphozyten, kleinen hellen Lymphozyten, mittleren hellen Lymphozyten, großen hellen Lymphozyten, eosinophilen Granulozyten und Mastzellen gab es keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Gleiches gilt für die prozentualen Verteilungswerte, außer bei großen hellen Lymphozyten in Prozent mit einem Signifikanzniveau von  $p = 0,024$  (siehe Tab. 10).

Tab. 10: Übersicht der p-Werte bei Homogenität der Varianzen

	p (Absolut)	p (Prozent)
<b>kleine dunkle Lymphozyten</b>	0,395	0,421
<b>kleine helle Lymphozyten</b>	0,415	0,495
<b>mittlere helle Lymphozyten</b>	0,537	0,525
<b>große helle Lymphozyten</b>	0,083	0,024
<b>eosinophile Granulozyten</b>	0,471	0,405
<b>Plasmazellen</b>	---	0,468
<b>Mastzellen</b>	0,166	0,115

Tabellarische Darstellung der p-Werte aus dem einfaktoriellen ANOVA-Test bezüglich Altersgruppenunterschiede für die Absolut- und Prozentzahlen der Entzündungszellpopulationen bei angenommener Homogenität der Varianzen durch den Levene-Test, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .

Bei den Parametern große granulierte Lymphozyten, große granulierte Lymphozyten in Prozent, neutrophile Granulozyten, neutrophile Granulozyten in Prozent und Plasmazellen liegt keine Normalverteilung vor. Deswegen wurde hier der nichtparametrische Kruskal-Wallis-Test verwendet. Die Ergebnisse sind in Tabelle 11 dargestellt. Hier konnte nur ein Altersunterschied bei den großen granulierten Lymphozyten in der Absolutzahl ( $p = 0,049$ ) gefunden werden.

Tab. 11: Übersicht der p-Werte der nicht normalverteilten Parameter

	p für Absolutzahl	p für Prozent
<b>große granulierte Lymphozyten</b>	0,049	0,071
<b>neutrophile Granulozyten</b>	0,248	0,232
<b>Plasmazellen</b>	0,418	---

Tabellarische Darstellung der p-Werte aus dem Kruskal-Wallis-Test bezüglich Altersgruppenunterschiede für die Absolut- und Prozentzahlen der Entzündungszellpopulationen ohne Normalverteilung, Signifikanzniveau  $p < 0,05$ .



#### 4.7.1 Großen helle Lymphozyten

Im Mehrfachvergleich der großen hellen Lymphozyten (%) mit dem Tukey-HSD-Test konnte ein Unterschied zwischen der Gruppe der jungen Hunde (1) und der Gruppe der mittelalten Hunde (2) mit  $p = 0,033$  festgestellt werden, nicht aber zwischen der Gruppe (1) und der Gruppe der alten Hunde (3) ( $p = 0,067$ ) bzw. zwischen den Gruppen (2) und (3) ( $p = 0,963$ ). In der Gruppe (1) kommen mehr große helle Lymphozyten vor, als in der Gruppe (2) (siehe Tab. 12).

Tab. 12: Mittelwertvergleich der großen hellen Lymphozyten

	n	$\bar{x}$	s	$X_{\min}$ (%)	$X_{\max}$ (%)
<b>Gruppe (1)</b>	9	0,3	0,16	0,11	0,55
<b>Gruppe (2)</b>	9	0,14	0,11	0	0,28
<b>Gruppe (3)</b>	8	0,15	0,09	0	0,27

Darstellung der Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) mit der Standardabweichung (s) der großen hellen Lymphozyten in den drei Altersgruppen sowie die Minima und Maxima der Prozentzahlen.

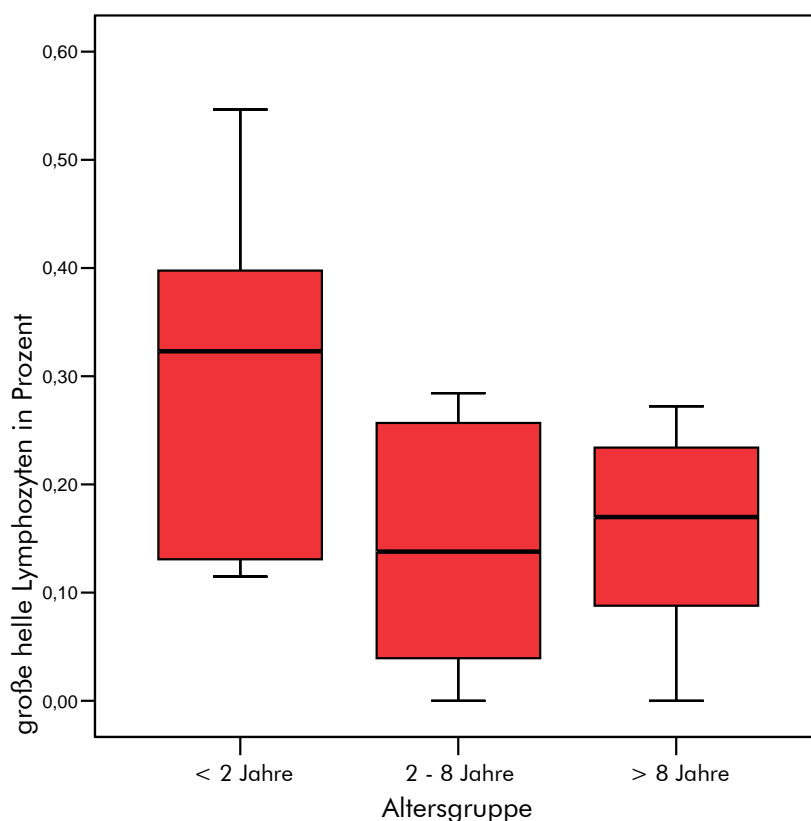


Abb. 16: Graphische Darstellung der prozentualen Verteilung der großen hellen Lymphozyten in den drei Altersgruppen (Median, 25. und 75. Perzentil, 10. und 90. Perzentil)

#### 4.7.2 Große granulierte Lymphozyten

Im Gruppenvergleich (Mann-Whitney-Test) besteht auch hier der Unterschied zwischen der Gruppe (1) und der Gruppe (2), nicht aber zwischen der Gruppe (1) und (3) ( $p = 0,059$ ) bzw. (2) und (3) ( $p = 0,963$ ). In der Gruppe (1) kommen signifikant mehr große granulierte Lymphozyten vor als in Gruppe (2) (siehe Tab. 13).

Tab. 13: Mittelwertvergleich der großen granulierten Lymphozyten

	$\bar{x}$	s	$X_{\min}$	$X_{\max}$	$\bar{x}$ (%)	s	$X_{\min}$ (%)	$X_{\max}$ (%)
<b>Gruppe (1)</b>	2,33	2,14	0	5,7	0,136	0,15	0	0,35
<b>Gruppe (2)</b>	0,54	1,1	0	3,3	0,03	0,07	0	0,22
<b>Gruppe (3)</b>	0,66	1,0	0	2,5	0,03	0,04	0	0,09

Darstellung der Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) mit der Standardabweichung (s) der großen granulierten Lymphozyten in den drei Altersgruppen sowie die Minima und Maxima der Absolut- und Prozentzahlen.

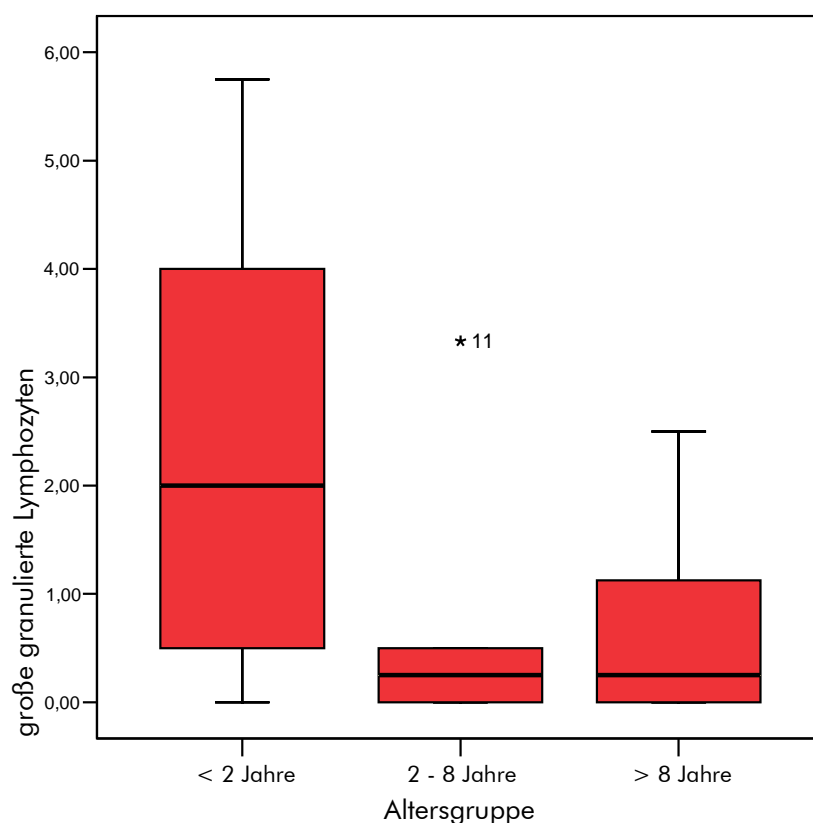


Abb. 17: Graphische Darstellung der Verteilung der großen granulierten Lymphozyten in den drei Altersgruppen (Median, 25. und 75. Perzentil, 10. und 90. Perzentil)

Innerhalb der Gruppe (1) ist ein signifikanter Unterschied (Kruskal-Wallis-Test,  $p = 0,014$ ) in der Verteilung der großen granulierten Lymphozyten bei Hunden bis zu zwölf Monaten ( $n = 4$ ) und Hunden zwischen zwölf und 24 Monaten ( $n = 5$ ) zu erkennen. Bei sehr jungen Hunden kommen deutlich mehr große granulierten Lymphozyten vor als bei den älteren (Mann-Whitney-Test, siehe Tab. 14).

Tab. 14: Mittelwerte der großen granulierten Lymphozyten

	n	$\bar{x}$	s	$X_{\min}$	$X_{\max}$
<b>&lt; 12 Monate</b>	4	4,3	1,4	2,5	5,75
<b>12 – 24 Monate</b>	5	0,75	0,79	0	2
<b>Insgesamt</b>	9	2,33	2,14	0	5,75

Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) mit der Standardabweichung (s) für die großen granulierten Lymphozyten bei Hunden mit einem Alter von bis zu 12 Monaten und bei Hunden mit einem Alter von 12 bis 24 Monaten sowie die Minima und Maxima.

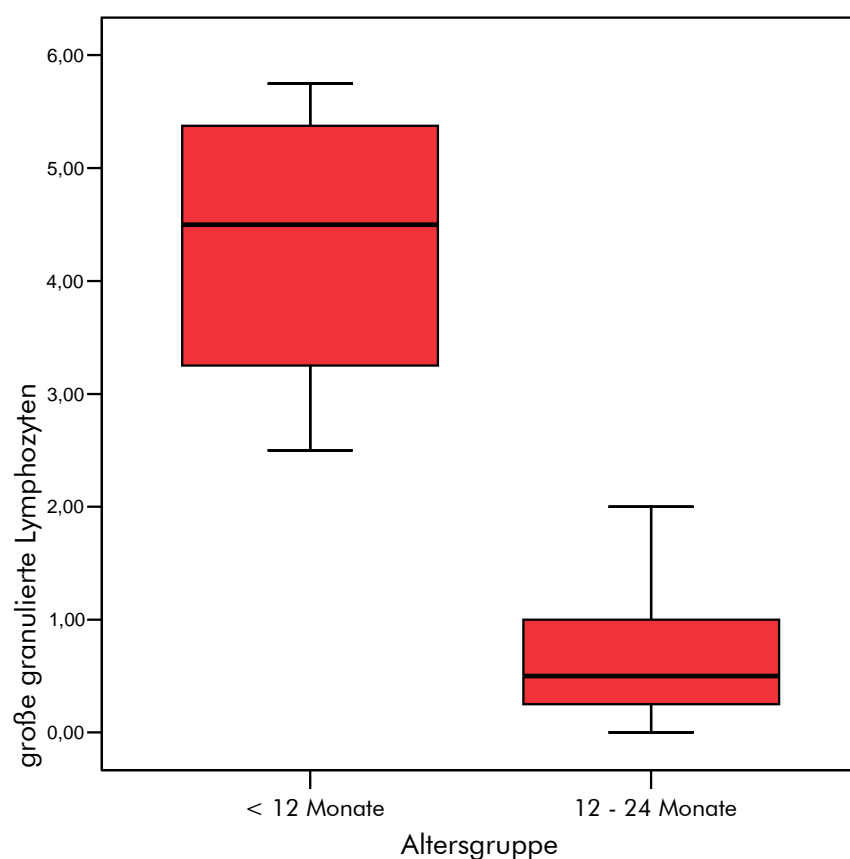


Abb. 18: Graphische Darstellung der Verteilung der großen granulierten Lymphozyten innerhalb der Gruppe 1 (Median, 25. und 75. Perzentil, 10. und 90. Perzentil,  $p = 0,014$ ).

### 4.7.3 Differenzialblutbild

Bei den Zellen des Differenzialblutbildes gibt es für die neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Altersgruppen. Bei den eosinophilen Granulozyten konnte ein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,028$ ).

Im Mehrfachvergleich (siehe Tab. 15) mit dem Tukey-HSD-Test konnte ein Unterschied zwischen der Gruppe der jungen Hunde (1) und der Gruppe der alten Hunde (3) mit  $p = 0,024$  festgestellt werden. In der Gruppe (1) kommen mehr eosinophile Granulozyten im peripheren Blut vor, als in der Gruppe (3).

Tab. 15 : Mittelwertvergleich der eosinophilen Granulozyten im Differenzialblutbild

	n	$\bar{x}$ (%)	s (%)	$X_{\min}$ (%)	$X_{\max}$ (%)
<b>Gruppe (1)</b>	9	11	6,2	5	24
<b>Gruppe (2)</b>	9	6	4,5	0	14
<b>Gruppe (3)</b>	8	4	2,9	0	8

Darstellung der Mittelwerte ( $\bar{x}$ ) mit der Standardabweichung (s) der eosinophilen Granulozyten (%) im peripheren Blut in den drei Altersgruppen sowie die Minima und Maxima.

## **5 DISKUSSION**

### **5.1 Diskussion der Methode**

Die Patienten wurden im Rahmen von geplanten Routineeingriffen in der Klinik für Kleintiere der Universität Leipzig vorgestellt. Die Endoskopie wurde mit Zustimmung der Besitzer durchgeführt. Die Auswahl der Tiere erfolgte an Hand einer ausführlichen Anamnese, vor allem bezüglich gastrointestinaler Vorerkrankungen, Medikamentenapplikationen in der Vergangenheit sowie anderen Erkrankungen. Wenn auch die eingeleiteten Laboruntersuchungen ohne besonderen Befund blieben, wurde der Patient als gesund befundet. Im Gegensatz zu anderen zytologischen Untersuchungen von endoskopisch gewonnenen Darmbiopsien bei Hunden und Katzen (JERGENS et al. 1997; JERGENS et al. 1998) wurde versucht, Krankheiten oder Umstände, die eine Veränderung im Bereich der Darmschleimhaut verursachen können, auszuschließen. Dennoch ist eine intestinale Erkrankung mit den durchgeführten Untersuchungen nicht vollständig ausschließbar.

Die Patienten stammen aus unterschiedlichen Haltungen und Umgebungen. Einige Tiere stammten aus Einzelhaltung, andere aus einem „Mehrhundehaushalt“. Es waren Zwingerhunde, Hofhunde und Wohnungshunde sowie Hunde unterschiedlicher Nutzungsfunktion. Insbesondere die Abstammung und Haltung der Hunde hat einen signifikanten Einfluss auf den Verwurmungsstatus. In einer australischen Studie konnte nachgewiesen werden, dass Hunde aus Zoohandlungen eine hohe Prävalenz von gastrointestinalen Parasiten aufwiesen, während Hunde aus Hundeschulen nur eine geringe Prävalenz haben. Auch Hunde unter sechs Monaten, Hunde die in Haushalten mit mehr als einem Hund leben sowie Hunde aus Tierheimen haben einen signifikant höheren Verwurmungsstatus (BUGG et al. 1999). Parasiten spielen gerade bei jungen Hunden eine große Rolle für das gastrointestinale Immunsystem, wie in verschiedenen Untersuchungen gezeigt werden konnte (VISCO et al. 1977; KIRKPATRICK 1988; BUGG et al. 1999; RUBEL et al. 2003; ITOH et al. 2003; RAMIREZ-BARRIOS et al. 2004). Um eine parasitäre Belastung der Patienten auszuschließen, wurden parasitologische Kotuntersuchungen und ein ELISA bezüglich des Nachweises von Giardien-Antigen durchgeführt. Patienten mit einem positiven Befund wurden von der Untersuchung ausgeschlossen. Dennoch ist die Möglichkeit gegeben, eine Kotprobe trotz Parasitenbefall als negativ zu beurteilen, da Hunde meist keine Dauerausscheider

sind. Des Weiteren ist unklar, wie lange eventuelle Zellveränderungen im Darm nach der Behandlung mit Antiparasitika persistieren. Zytologisch konnte bei keinem Patienten ein direkter Hinweis auf eine parasitäre Infektion festgestellt werden, wie es zum Beispiel bei Giardien im Abklatschpräparat möglich wäre (DEBONGNIE et al. 1994). Allerdings konnte eine Altersabhängigkeit bei großen hellen Lymphozyten nachgewiesen werden. Diese Zellart kommt vermehrt bei jungen Hunden und insbesondere bei Hunden bis zu einem Alter von einem Jahr vor. Ihnen schreibt man eine wesentliche Rolle in der Abwehr von Parasiteninfektion zu (RUITENBERG u. ELGERSMA 1979; RUITENBERG u. ELGERSMA 1980; DOUCH et al. 1986; BAERT 1989; AKPAVIE u. PIRIE 1993). Da die Kotuntersuchungen auch bei diesen Patienten mit einem negativen Ergebnis verliefen, ist anzunehmen, dass das vermehrte Vorkommen der großen granulierten Lymphozyten nicht unmittelbar mit aktuellen Parasiteninfektionen assoziiert ist.

In allen Altersgruppen waren Hunde von kleinen und großen Rassen und deren Mischlinge vertreten. Inwiefern die Hunderasse auf das gastrointestinale Immunsystem einen Einfluss hat, ist unklar. In dieser Untersuchung waren keine Unterschiede zwischen den Hunden festzustellen, so dass die Hunderasse sehr wahrscheinlich keine große Rolle spielt. Hunderassen, bei denen eine Prädisposition für bestimmte gastrointestinale Erkrankungen bekannt ist, sind in dieser Studie kaum vorhanden. In Gruppe (1) war ein Deutscher Schäferhund vertreten. Für diese Hunderasse wird eine Prädisposition für eine Bakterienüberbesiedelung im Zusammenhang mit einem IgA-Defizit beschrieben (ELWOOD et al. 1996; GERMAN et al. 2001). Andere Rassen, zum Beispiel der Irish Setter, für den eine Prädisposition für eine Gluten-sensitive Enteropathie bekannt ist (ELWOOD et al. 1996; GARDEN 2001), kamen in dieser Untersuchung nicht vor.

Um fütterungsbedingte Einflüsse auszuschließen, wurden Hunde, von denen bekannt war, dass sie schon einmal Unverträglichkeitsreaktionen auf ein bestimmtes Futter gezeigt haben, nicht mit in diese Studie aufgenommen. Weitere Einschränkungen bezüglich der Fütterungsanamnese waren nicht möglich. Eine serologische Untersuchung bezüglich einer IgE und IgG-Antwort auf verschiedene Futtermittelantigene erscheint auf Grund der geringen Sensitivität und Spezifität wenig sinnvoll (FOSTER et al. 2003; KENNIS 2006). Ob die verschiedenen handelsüblichen Futtermittel und die Art der Fütterung einen Einfluss auf die Ergebnisse dieser Untersuchung hat, kann somit nicht eindeutig beantwortet werden.

Allerdings sind die vorliegenden Ergebnisse so homogen, dass zumindest für diese Untersuchung, die Art der Fütterung eine untergeordnete Rolle zu spielen scheint. Dass Futtermittel auf das systemische und gastrointestinale Immunsystem sowohl positiven als auch negativen Einfluss ausüben können, haben viele Autoren untersucht und beschrieben (SHEFFY u. WILLIAMS 1981; LANGKAMP-HENKEN et al. 1992b; ZENTEK u. MEYER 1995; MANHART et al. 2000; GERMAN et al. 2001; KEALY et al. 2002; MASSIMINO et al. 2003; ZENTEK et al. 2003).

Für die Untersuchung des Alterseinflusses auf die Entzündungszellverteilung in der Darmschleimhaut wurden die Patienten in drei Altersgruppen eingeteilt. Die Entscheidung die Altersgruppen zu gliedern in 1. jünger als zwei Jahre, 2. zwei bis acht Jahre und 3. älter als acht Jahre erfolgte in Anlehnung an andere Arbeiten (STOCKHAUS et al. 2002). Diese Einteilung erscheint im Nachhinein zu grob für die Prüfung des Alterseinflusses auf die Entzündungszellen der Darmschleimhaut. Hundewelpen werden mit einem relativ kompetenten Immunsystem geboren, das sich innerhalb weniger Wochen deutlich weiterentwickelt und auf externe Stimuli reagieren kann (TOMAN et al. 2002; FALDYNA et al. 2005). Gerade in den ersten Lebenswochen kommt es zu Umverteilungen innerhalb der Lymphozytenpopulationen (GREELEY et al. 1996; STRASSER et al. 2000; GREELEY et al. 2001; TOMAN et al. 2002). Auch innerhalb der Darmschleimhaut konnten zelluläre Veränderungen innerhalb der ersten vier Lebensmonate festgestellt werden (THOMAS u. ANDERSON 1982). Sehr junge Patienten sind in dieser Untersuchung nicht vertreten. Das Alter des jüngsten Hundes war sechs Monate. Deutliche Unterschiede sind nach histologischen und immunhistologischen Untersuchungen zu einem wesentlich früheren Zeitpunkt zu erwarten. Zumindest für zwei Zellarten wies auch diese Untersuchung eine Altersabhängigkeit nach (siehe Kapitel 5.2.6.).

Die Patienten wurden im Rahmen von elektiven Eingriffen vorgestellt. Es wurden nur solche Patienten für die Studie ausgewählt, bei denen der Grund des Eingriffes vermutlich keinen Einfluss auf den Magen-Darm-Kanal hat. In erster Linie handelte es sich um Unterbindungen der Fortpflanzungsfähigkeit (Ovariohysterektomie und Rüdenkastration) und Zahnfrakturen. Ein kritischer Punkt ist die Zahnsteinentfernung. In wie fern es durch den Zahnsteinbefall zu einer Keimstreuung in den Organismus mit zellulären Veränderungen im Bereich des intestinalen Immunsystems kommt, müssten gesonderte Untersuchungen zeigen. Außer in Gruppe (3) ist der Anteil der Zahnsteinentfernungen mit einem Vertreter in Gruppe

(2) sehr gering. Die Homogenität der Ergebnisse lässt aber vermuten, dass es zu keinen nennenswerten zytologischen Veränderungen bei den Hunden mit Zahnstein gekommen ist.

## **5.2 Diskussion der Ergebnisse**

### **5.2.1 Allgemeine Kriterien**

Bakterien konnten nur bei zwei Patienten in den zytologischen Präparaten gefunden werden. Es wurden nur die Präparate als positiv bezüglich des Kriteriums Bakteriengehalt gewertet, bei denen eine Identifikation möglich war; zum Beispiel eine Kontamination mit *Simonsiella* aus der Maulhöhle. Das seltene Vorkommen von Bakterien deckt sich mit der zytologischen Beschreibung von (BAKER u. LUMSDEN 2000), wo Bakterien normalerweise nicht oder nur in sehr geringer Anzahl erkennbar waren. Ähnlich dem Magen ist die Anzahl und Verteilung der intestinalen Flora stabil und steht in einem symbiotischen Wechselspiel mit dem Tier. Im Leerzustand sind der Magen und kraniale Dünndarmabschnitte steril, erst mit der Futteraufnahme kommt es zu einem pH-Anstieg und gleichzeitig steigt der Gehalt an Mikroorganismen an (GORBACH et al. 1967; DRASAR u. HILL 1974; SIMON u. GORBACH 1987). Das erklärt, warum keine Bakterien in der Dünndarm-Zytologie zu erkennen sind.

In der parasitologischen Kotuntersuchung wurde ein Parasitenbefall bei den Patienten ausgeschlossen. Entsprechend konnten Parasiten, das heißt Wurmeier, Larven oder auch Giardien in keinem Präparat dieser Studie entdeckt werden. Vor allem Giardien sind auch in Duodenalbiopsien zytologisch auffindbar (DEBONGNIE et al. 1994).

In den Abklatschpräparaten aus dem Dünndarm kamen vereinzelt weit differenzierte Plattenepithelzellen vor. Sie sind durch die Endoskopie oder im Rahmen des natürlichen Abschilferungsprozesses mit dem Speichel abgeschluckt und so in den Darm gelangt. Für die Bewertung der Enterozyten und Entzündungszellen spielten diese Zellen keine Rolle.

### **5.2.2 Zellpopulationen und deren Anordnung**

Im Gegensatz zu bisher veröffentlichten Untersuchungen über die zytologische Untersuchung von endoskopisch gewonnenen Darmbiopsien des Hundes



(JERGENS et al. 1997; JERGENS et al. 1998) wurden in dieser Arbeit Absolutzahlen und deren prozentualen Werte als Grundlage zur Beschreibung des physiologischen Zellbildes herangezogen.

Im Mittel wurden pro Objektträger 2119 einzelne Zellen, bestehend aus Enterozyten, sezernierenden Enterozyten, Lymphozyten unterschiedlicher Größe und Anfärbung, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten, Plasmazellen und Mastzellen gezählt. Den überwiegenden Anteil mit bis zu 97 % machen hier die Enterozyten aus. Die sezernierenden Enterozyten kommen mit maximal 2,1 % der Gesamtpopulation in den zytologischen Abklatschpräparaten nur zu einem geringen Prozentteil vor. Auch in der Histologie stellen sie nur einen geringen Anteil dar. Gewöhnlich ist die Zahl in der Kryptenregion der Darmschleimhaut größer als im Zottenepithel. Insgesamt steigt ihre Anzahl vom Duodenum zum Ileum kontinuierlich an (LIEBICH 1990b).

In histologischen Untersuchungen an der gesunden Dünndarmschleimhaut des Hundes konnten je 100 Enterozyten vier Becherzellen im Bereich des Villus und neun im Bereich der Krypten gezählt werden (GERMAN et al. 1999). Das sind deutlich mehr als zytologisch erkannt werden konnten. Der Umstand, dass sie in den Abklatschpräparaten selten zu erkennen sind, kann mit der natürlichen Lokalisation im Drüsenepithel im Bereich der Krypten und ihr steigendes Aufkommen in Richtung Ileum zu erklären sein. Mit dem in dieser Untersuchung verwendeten endoskopischen Untersuchungsverfahren gelangt man nur in den kranialen Abschnitt des Duodenums. Eine retrograde endoskopische Besichtigung über den Ileumsphinkter wurde hier nicht durchgeführt. Des Weiteren werden mit der Forceps-Biopsie zum großen Teil nur die oberflächlichen Villusbereiche biopsiert.

Eine weitere Zellart, die auch vorwiegend zwischen den Enterozyten zu finden ist, stellen die dunklen Lymphozyten dar. Zytologisch nahmen sie einen geringeren Anteil von bis zu 6,9 % der Gesamtpopulation ein. Verglichen mit der Histologie der Darmschleimhaut kann man sie wahrscheinlich den intraepithelialen Leukozyten zuordnen. Intraepitheliale Leukozyten sind gleichmäßig von der Villusspitze bis in die Kryptenregion zwischen den Epithelzellen lokalisiert. Es besteht eine enge Beziehung zwischen intraepithelialen Leukozyten und Epithelzellen (KAWABATA et al. 1998). Charakteristisch für diese Zellen ist, dass sie in der Lage sind, sich zwischen die Enterozyten zu drängen und dass sie zu einer ausgeprägten Formvarianz des Kernes neigen. Dieser Umstand macht eine Größenbeurteilung

unmöglich, weshalb diese Zellen allgemein als dunkle kleine Lymphozyten beschrieben wurden. Im Jejunum gesunder Hunde stellen histologisch annähernd 11 - 15 von 100 epithelialen Zellen intraepitheliale Lymphozyten dar (THOMAS u. ANDERSON 1982); das heißt etwa 11 - 15 % der Zellpopulation. Weiterhin konnte eine Altersabhängigkeit nachgewiesen werden. Die Mittelwerte waren höher bei über sechs Wochen alten Hunden als bei bis zu 14 Tage alten Hunden. Im Alter von vier Monaten wurde ein leichter Abfall festgestellt. In einer immunhistologischen Untersuchung wurden im Mittel 20 intraepitheliale Leukozyten auf 100 Enterozyten gezählt (GERMAN et al. 1999).

Zytologisch konnten deutlich weniger intraepitheliale Leukozyten gezählt werden. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass sie bei der Präparateherstellung durch die Abklatschtechnik nicht so gut auf dem Objektträger haften bleiben. Für die Aufbereitung histologischer Schnittpräparate wird dagegen die gesamte Gewebeschicht geschnitten und fixiert. Des Weiteren sind sie zwischen den Enterozyten schwer zu erkennen und deutlich abzugrenzen. Eine Altersabhängigkeit konnte nicht erkannt werden. Allerdings wurde in einer histologischen Studie ein Unterschied bei Hunden mit einem Alter von zwei Wochen bis vier Monaten festgestellt (THOMAS u. ANDERSON 1982). Die Hunde in der vorliegenden Arbeit waren demgegenüber alle älter. Die Vermehrung der intraepithelialen Lymphozyten in diesem Alter wird mit einer intensiven Stimulation durch eine Vielzahl an intra-luminalen Antigen im Zusammenhang gebracht. Unter anderem findet zu diesem Zeitpunkt auch eine Umstellung von Muttermilch auf Futter statt (THOMAS u. ANDERSON 1982). Im gesunden Darm ist der größte Anteil der intraepithelialen T-Lymphozyten vom zytotoxischen beziehungsweise Suppressor-Phenotyp (BIENENSTOCK u. BEFUS 1984; HANAUER u. KRAFT 1985; HARTY u. LEIBACH 1985; CARMAN et al. 1986). Die konkrete Zuordnung in Bezug auf die zytologisch sichtbaren intraepithelialen Leukozyten ist nur mit speziellen Verfahren, zum Beispiel Fluoreszenzmikroskopie möglich, weshalb hier keine weiteren Aussagen darüber gemacht werden können.

Die hellen Lymphozyten können in drei Größen unterteilt werden: klein, mittel, groß. Allen ist zu Eigen, dass sie vorwiegend außen um einen Epithelverband herum gelagert sind, einzeln oder zu mehreren in einer Zelllage. Im Gegensatz zu den anderen Entzündungszellen scheint ein enger Kontakt zu den Epithelzellen dennoch zu bestehen. Selten sind sie aus dem Verband heraus abseits gelegen. Die kleinen hellen Lymphozyten (9 - 12 µm) machen bis zu 3,7 % der gesamten Zellpopulation

auf einem Objektträger aus. Den größten Anteil überhaupt bilden die mittleren hellen Lymphozyten (12 - 18  $\mu\text{m}$ ) mit bis zu 7,2 %. Ein sehr kleiner Teil wird durch die großen Lymphozyten (18 - 25  $\mu\text{m}$ ) mit bis zu 0,55 % dargestellt.

Nach histologischen Gesichtspunkten kann man hellen Lymphozyten die Funktion als Lymphozyt aus der Lamina propria, die durch die Biopsietechnik und Abklatschtechnik in diese Position gebracht wurden, zuschreiben. Es sind vorwiegend IgA-produzierende B-Zellen und T-Gedächtniszellen (BARLOUGH et al. 1981; WILLARD et al. 1982; JAMES 1993). Die relative Anzahl von B- und T-Zellen sowie anderen Leukozyten im Darm ist abhängig von der Antigen-Stimulation, dem Alter des Tieres und der Lokalisation (WILLARD u. LEID 1981; WILLARD et al. 1982). Zytologisch ist eine Differenzierung in T- und B-Lymphozyten nicht möglich. Allgemein gilt, dass die T-Lymphozyten kleiner als die B-Lymphozyten sind. Inwieweit sich das auf die Zytologie des Dünndarmes übertragen lässt, können nur immunzytologische Untersuchungen zeigen. Dieser Umstand macht einen direkten Vergleich mit histologischen und immunhistologischen Untersuchungen bezüglich der prozentualen Verteilung der Lymphozyten aus der Lamina propria unmöglich. Beschreibungen der Lymphozytenverteilung in diesen Untersuchungen beinhalten die Differenzierung der verschiedenen Lymphozytensubpopulationen (GERMAN et al. 1999; SONEA et al. 2000). Die Zahlen, die somit entstehen, sind nicht unmittelbar mit denen dieser Untersuchung vergleichbar. Ähnlich deutlich aber ist die Tendenz erkennbar, dass die Lymphozyten den größten Anteil der Entzündungszellen einnehmen.

In den zytologischen Präparaten dieser Untersuchung wurden bis zu insgesamt 11 % helle Lymphozyten gezählt. Diese Angabe bezieht sich auf die Gesamtzellzahl auf einem Objektträger und stellt die Relation zu den Enterozyten dar. Der Vergleich zu immunhistologischen Untersuchungen ist in sofern nicht möglich, da hier die Entzündungszellen nicht in Relation zu den Enterozyten verglichen wurden, sondern in einem Feld von 10.000  $\mu\text{m}^2$  als absolute Zahlen angegeben werden (GERMAN et al. 1999). Hier wurden insgesamt im Mittel bis zu 120 T-Lymphozyten (CD3, CD4, CD5 und CD8) in einem entsprechenden Feld ausgezählt, aber nur sechs Zellen konnten zu Plasmazellen, Mastzellen oder eosinophilen Granulozyten zugeordnet werden.

Eine auffallende Zellart in der Zytologie des Darmes stellen die großen granulierten Lymphozyten dar. Sie sind eine Sonderform der Lymphozyten („large granular lymphocytes“ oder „globule leucocyte“). Sie kommen mit bis zu 0,35 % nur in sehr geringem Maße in den zytologischen Abklatschpräparaten vom Dünndarm vor. Ähnlich den intraepithelialen Leukozyten, befinden sie sich hauptsächlich zwischen den Enterozyten.

Bei den großen granulierten Lymphozyten konnte ein signifikanter Altersunterschied bei den jungen Hunden festgestellt werden. Hier kommen sie deutlich häufiger vor als bei den Hunden mittleren Alters und bei den alten Hunden. Angaben über das quantitative Vorkommen der großen granulierten Lymphozyten im Darm gesunder Hunde konnten nicht gefunden werden. Histologisch sind sie im intestinalen Epithel der Krypten und niedrigeren Villi und in der Lamina propria lokalisiert. Daneben konnten sie auch in vielen anderen Geweben, unter anderem im Blut, Knochenmark, Milz, Lunge, Leber, Gallenblase, Uterus und Plazenta bei gesunden Individuen nachgewiesen werden (WELLMAN 2000).

Untersuchungen bezüglich des Auftretens von großen granulierten Lymphozyten sind vor allem bei Wiederkäuern und Labornagern im Zusammenhang mit parasitären Infektionen durchgeführt worden (RUITENBERG u. ELGERSMA 1979; RUITENBERG u. ELGERSMA 1980; DOUCH et al. 1986; AKPAVIE u. PIRIE 1989; BAERT 1989; AKPAVIE u. PIRIE 1993). Bei Schafen konnte eine starke Assoziation zwischen der Resistenz gegen eine Nematodeninfektion und der Präsenz der großen granulierten Lymphozyten festgestellt werden, ebenso eine Korrelation der großen granulierten Lymphozyten und eosinophilen Granulozyten mit der antiparasitären Aktivität im Mukus (DOUCH et al. 1986). Des Weiteren wurde in einer anderen Studie eine Altersabhängigkeit im Bezug auf das Vorkommen der großen granulierten Lymphozyten beim Schaf festgestellt (DOUCH u. MORUM 1993). In der Literatur lassen sich nur sehr wenige Berichte über das Auftreten von großen granulierten Lymphozyten bei Hund und Katze finden.

Neutrophile Granulozyten waren in den zytologischen Präparaten nur unregelmäßig in wenigen Präparaten vorhanden mit einem Gesamtvorkommen von bis zu 0,14 %. Dieses Ergebnis entspricht dem Ergebnis einer humanmedizinischen histologischen Studie. Dort machen neutrophile Granulozyten zusammen mit eosinophilen Granulozyten, Mastzellen und Makrophagen insgesamt weniger als 1 % der Leuko-

zyten in der Lamina propria aus (HANAUER u. KRAFT 1985), während ihre Anzahl sowohl in der Lamina propria als auch im Epithel bei verschiedenen Formen der Duodenitis deutlich ansteigt (HASAN et al. 1983; VAN GARDEREN et al. 1991).

Im peripheren Blutkreislauf treten eosinophile Granulozyten im Gegensatz zu den neutrophilen Granulozyten in geringerer Anzahl auf, während sie in den zytologischen Präparaten des Dünndarms dieser Untersuchung mit bis zu 0,49 % deutlich häufiger vorzufinden waren als die neutrophilen Granulozyten. Diese Angabe deckt sich mit anderen Untersuchungen, wo eosinophile Granulozyten weniger als 1 % der Zellpopulation aus der Lamina propria beim Hund ausmachen (GUILFORD u. STROMBECK 1996). Im Gegensatz dazu wird in einer anderen Studie eine Absolutzahl von vier bis zehn eosinophilen Granulozyten, mit einer ansteigenden Häufigkeit von der Villusspitze in Richtung der Krypte, in einem Feld von  $10.000\ \mu\text{m}^2$  angegeben (GERMAN et al. 1999). Allerdings konnte hier eine parasitäre Infektion bei den Patienten nicht völlig ausgeschlossen werden (GERMAN et al. 1999).

Ähnlich der Lymphozytenpopulation ist auch hier der direkte Vergleich, auf Grund der unterschiedlichen Zählweise, nicht möglich. Der Trend bezüglich der Gesamtverteilung aller Entzündungszellen ist aber auch hier gleich. Während bei den Patienten in der manuellen Differenzierung des Blutausriches ein signifikant höheres Vorkommen der eosinophilen Granulozyten bei den jungen Hunden nachzuweisen war, konnte dieses Verhältnis auf die zytologische Auswertung der Darmpräparate nicht übertragen werden. Hier besteht kein signifikanter Unterschied im Vorkommen von eosinophiler Granulozyten. Es besteht auch keine Korrelation zwischen der Anzahl eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut und der im zytologischen Präparat. Das heißt, Patienten mit einer Vermehrung der eosinophilen Granulozyten im peripheren Blut (Eosinophilie) zeigten nicht gleichzeitig mehr eosinophile Granulozyten im Präparat und umgekehrt.

Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten im Darmlumen korreliert mit der antiparasitären Aktivität im Mukus, wie eine Studie bei Schafen zeigte (DOUCH et al. 1986). Entsprechend einer anderen Arbeit bei Schafen (DOUCH u. MORUM 1993) liegt eine Altersabhängigkeit in der vorliegenden Arbeit nicht vor.

Plasmazellen entstehen unter dem Einfluss aktivierter T-Helferzellen durch Transformation aus B-Lymphozyten. Sie synthetisieren spezifische  $\gamma$ -Immunglobuline

(Antikörper) und werden zu langlebigen B-Gedächtniszellen, die bei erneutem Antigenkontakt schneller reagieren können (LIEBICH 1990a). In der gesunden Darmschleimhaut kommen sie zytologisch in dieser Untersuchung nur zu einem sehr geringen Anteil von bis zu 0,1 % vor. Die direkte Gegenüberstellung zu immunhistologischen Untersuchungen ist auch hier gleichermaßen schwierig, wie bei den anderen Entzündungszellen. Plasmazellen werden ebenso wie die hellen Lymphozyten, eosinophilen und neutrophilen Granulozyten sowie Mastzellen zu den Zellen der Lamina propria gezählt. Die Angaben der Häufigkeitsverteilung wurden auch hier auf eine bestimmte Fläche bezogen. In immunhistologischen Untersuchungen bei gesunden Hunden werden Angaben im Mittel von bis zu sieben Plasmazellen in einem Feld von  $10.000\ \mu\text{m}^2$  gemacht (GERMAN et al. 1999).

Allerdings konnte in morphometrischen Analysen festgestellt werden, dass Plasmazellen vorwiegend in der Region der Krypten vorkommen. Dem gegenüber wurde in der Villusspitze im Mittel nur eine Plasmazelle in einem entsprechenden Feld gezählt. Dieser Umstand und die andere Darstellungsweise erklären, warum in den zytologischen Präparaten ein deutlich geringerer Anteil an Plasmazellen vorkommt. Die endoskopisch gewonnenen Schleimhautbiopsien enthalten vorwiegend die oberflächlichen Bereiche der Darmschleimhaut, also die Villi. Die tiefer liegende Kryptenregion wird kaum erreicht. Vermutlich besteht auch die Schwierigkeit, im Gegensatz zu den immunhistologischen Untersuchungen, Plasmazellen als solche genau anzusprechen. Des Weiteren können die aus der Lamina propria stammenden Zellen bei der Präparateherstellung durch die Abklatschtechnik, im Gegensatz zu den histologischen Schnittpräparaten, nicht mit erfasst werden.

Von besonderem Interesse ist die Zahl der Plasmazellen bei der Diagnostik von spezifischen gastrointestinalen Entzündungsformen, bei denen ein vermehrtes Auftreten von Plasmazellen als Ausdruck eines gestörten gastrointestinalen Immunsystems zu verzeichnen ist.

Mastzellen zeigen im zytologischen Präparat der Dünndarmschleimhaut mit bis zu 0,11 % eine ähnliche Häufigkeit wie die Plasmazellen. Auch diese Angabe entspricht etwa der Häufigkeit, wie sie in histologischen und immunhistologischen Untersuchungen verschiedener Autoren bei verschiedenen Spezies angegeben wird (HANAUER u. KRAFT 1985; GERMAN et al. 1999). Hier ist wieder ein vermehrtes

Auftreten der Mastzellen im Bereich der Krypten zu erkennen. Im Bereich der Villusspitze konnte im Mittel nur eine Mastzelle in einem Feld von  $10.000\ \mu\text{m}^2$  beim gesunden Hund gezählt werden. Mögliche Ursachen für die Unterschiede der zytologischen Untersuchung zu der Immunhistologie sind die gleichen wie für die Plasmazellen.

Im Gegensatz zu den Lymphozyten und den großen granulierten Lymphozyten liegen die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Plasmazellen und Mastzellen vorwiegend frei und ohne Kontakt zu den Enterozyten. Vergleicht man die Häufigkeit der eosinophilen Granulozyten, neutrophilen Granulozyten und Mastzellen mit zusammen insgesamt 0,74 % in den zytologischen Präparaten, kann eine starke Korrelation zu histologischen Ergebnissen beim gesunden Menschen gefunden werden (HANAUER u. KRAFT 1985).

In dieser Studie wird ein prozentualer Anteil dieser Zellen von unter 1% angegeben. In mehreren immunhistologischen Untersuchungen werden genaue Angaben über die Anzahl der Entzündungszellen in der Darmschleimhaut, inklusive der Zellen der Lamina propria des gesunden Hundes gemacht (GERMAN et al. 1999). Wie schon mehrfach erwähnt ist der direkte Vergleich der Ergebnisse dieser zytologischen Untersuchung mit den Ergebnissen immunhistologischer Untersuchungen nicht möglich.

### **5.2.3 Zytologische Zellkriterien**

In dieser Untersuchung konnte in keinem Präparat eine Mitose gesehen werden. Mitosen sind im normalen Gewebe selten nachweisbar, können aber in bestimmten Geweben mit einer hohen Teilungsrate, zum Beispiel Lymphknoten, manchmal gesehen werden (CLINKENBEARD u. COWELL 1994). Da die Enterozyten im Körper zu den Geweben mit einer hohen Teilungsrate gehören, kann man mit Mitosen rechnen. Die Ursache, dass in dieser Untersuchung keine Mitosen gesehen wurden, kann in der Art der Materialgewinnung liegen. Die endoskopisch gewonnenen Forceps-Biopsien beinhalten nur die oberflächlichen Schichten der Darmwand, tiefere Bereiche der Krypten werden unter Umständen nicht erreicht. Hier befindet sich jedoch die Teilungszone für die Enterozyten, die während des Alterungsprozesses weiter Richtung Zottenspitze wandern.

Das Schleimhautepithel des Darmes zeigt zytologisch ausnahmslos einkernige Zellen. Die Kerne waren einheitlich rund bis oval und von dunkelblauer-violetter Färbung. Diese Beschreibung deckt sich mit den Ergebnissen anderer Untersuchungen (ANDREASEN et al. 2000). Unterschiede treten in der Beurteilung der Deutlichkeit der Kernkörperchen auf. Die Bewertung in dieser Studie unterschied die Deutlichkeit der Kernkörperchen in kaum erkennbar, erkennbar und deutlich erkennbar. In der Regel war pro Kern mindestens ein Kernkörperchen erkennbar. Nach ANDREASEN et al. (2000) sind die Kernkörperchen nur undeutlich erkennbar. Dieser Unterschied kann darin begründet sein, dass verschiedene Färbungen angewendet wurden. (ANDREASEN et al. 2000) verwendeten eine Romanowsky-Schnellfärbung nach Wright. Die Präparate dieser Studie wurden auch nach dem Romanowsky-Typ, allerdings als eine panoptische Färbung nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt. Hier werden verschiedene Verfahren (May-Grünwald und Giemsa) kombiniert. Das Ergebnis sind kräftigere Farben.

In dieser Untersuchung zeichnet sich das Chromatin der Enterozytenkerne durch eine gleichmäßig feingranulierte bis granulierte Struktur aus. Das entspricht der allgemeinen Beschreibung der Chromatinstruktur nicht-neoplastischer Zellen. Bei malignen Neoplasien verdichtet sich häufig das Chromatinmuster. Es erscheint gröber bis verklumpt (CLINKENBEARD u. COWELL 1994).

Die Zellkerne der Enterozyten enthalten meist einen Nukleolus, manchmal aber auch zwei. Dieses Ergebnis deckt sich mit anderen Beschreibungen (ANDREASEN et al. 2000).

Die Kernkörperchen von Enterozyten in dieser zytologischen Untersuchung sind, wie allgemein physiologisch beschrieben, klein ( $< 5 \mu\text{m}$ ) und überwiegend rund. Sie erscheinen meist dunkelblau und etwas dunkler als der Kern. Selten sind sie heller als der Kern selbst. Es treten aber auch Kernkörperchen mit eckiger Form in Erscheinung. Große Kernkörperchen und ebenso Kernkörperchen mit flachen, eckigen oder eingezogenen Kanten sind abnormal und können in malignen Zellen beobachtet werden (CLINKENBEARD u. COWELL 1994). Des Weiteren können formveränderte Kernkörperchen aber auch bei reaktiven Veränderungen, zum Beispiel in Leberzellen erkannt werden (STOCKHAUS et al. 2002).

Die Enterozyten liegen in Zellverbänden, in denen die Zellgrenzen nicht oder nur sehr vage als solche anzusprechen sind. Wie alle epithelialen Zellen zeichnen sie



sich durch einen starken Zusammenhalt aus (TYLER et al. 1989; CLINKENBEARD u. COWELL 1994). Die Zellgrenzen können dabei mehr oder weniger deutlich erkennbar sein.

Das Zytoplasma der Enterozyten ist von mittelblauer Farbe. ANDREASEN et al. (2000) beschreibt das Zytoplasma als hellblau. Eine mögliche Ursache für die unterschiedliche Beschreibung kann die unterschiedliche Färbemethode sein. Gleiches gilt für die Beschreibung der Deutlichkeit der Kernkörperchen. Des Weiteren ist die Bewertung von einem subjektiven Eindruck abhängig.

In dem Zytoplasma der Enterozyten waren nur wenige oder keine Vakuolen vorhanden. Im Gegensatz hierzu stehen die sezernierenden Enterozyten, welche durch eine große Anzahl von Vakuolen im Zytoplasma auffielen. Der Funktion der Enterozyten entsprechend handelt es sich vermutlich um sekrethaltige Vakuolen und stellt für die Enterozyten kein Kriterium für eine maligne Neoplasie dar (REBAR et al. 1982).

#### **5.2.4 Malignitätskriterien**

Ziel der Untersuchung der Malignitätskriterien bei den Enterozyten war die Beschreibung des Normalbefundes. Auffallend sind Kernmembranverdickungen und eckige Kernkörperchen, die vereinzelt erkannt werden konnten. Für die anderen Malignitätskriterien konnten keine Hinweise gefunden werden.

Form- und Größenveränderungen der Kernkörperchen sind abnormal und können bei Zellen in malignen Prozessen beobachtet werden, ebenso ausgeprägte Kernmembranverdickungen. Allerdings zeigen auch viele nicht-maligne Zellpopulationen als Zeichen einer Fehlentwicklung oder auch erhöhten Regenerationsleistung Malignitätskriterien (CLINKENBEARD u. COWELL 1994). Es müssen mindestens drei Malignitätskriterien vorhanden sein, um eine maligne Neoplasie als mögliche Diagnose in Betracht ziehen zu können (TYLER et al. 1989). So ist das gelegentliche Auftreten von Kernmembranverdickungen und eckigen Kernkörperchen bei den Enterozyten als Zeichen einer Fehlentwicklung oder eventuellen Reaktivität beziehungsweise Regeneration zu werten und nicht als Zeichen von Malignität.

### 5.2.5 Referenzbereiche

Ein Problem bei der gastrointestinalen Zytologie stellt die Definition bzw. Graduierung der pathologischen Biopsie dar, da es bis heute keine genauere Evaluierung der Zytologie des Magen-Darm-Kanals beim Kleintier gibt. Bisher wurden human-medizinische zytologische und histopathologische Kriterien benutzt. Zwar wurden semiquantitative zytologische Beurteilungskriterien für verschiedene Darmerkrankungen erarbeitet, jedoch ohne den physiologischen Befund als Grundlage zu nehmen (JERGENS et al. 1998). Erst Absolutzahlen beziehungsweise prozentuale Verteilungen und deren Referenzbereiche machen es möglich, objektive Diagnosekriterien für verschiedene gastrointestinale Erkrankungen zu erstellen.

Die Referenzwerte können als Absolutzahl oder als Prozentwert angegeben werden. Die Verwendung der Absolutzahlen ist in sofern problematisch, da sie die absolute Anzahl der pro Objektträger in zehn Gesichtsfeldern ausgezählten Zellen entspricht, deren Bestimmung mit einem erheblichen Zeitaufwand verbunden ist. Für die Praxis vertretbarer ist die Angabe als Prozentwert; das heißt, der Anteil der jeweiligen Zellart an der gesamt gezählten Zellzahl. Für eine möglichst genaue Angabe ist es wichtig, soviel Zellen wie möglich auszuzählen. In dieser Arbeit wurden pro Objektträger als Minimum 1404 Zellen, als Maximum 3009 Zellen, als Mittelwert 2119 Zellen ausgezählt. Diese Angabe stellt die Gesamtzellzahl, bestehend aus den Enterozyten, sezernierenden Enterozyten, den Lymphozytenpopulationen, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Plasmazellen und Mastzellen dar.

Naturgemäß bilden Enterozyten den größten Anteil von mindestens 85,44 % bis 97,01 % der Gesamtzellzahl (95%-Konfidenzintervall: 91,92 - 94,23 %). Deutlich geringer demgegenüber ist das Vorkommen der sezernierenden Enterozyten von 0,13 % bis zu 2,1 % (95%-Konfidenzintervall: 0,62 - 1,08 %). Das sind deutlich weniger, als in immunhistologischen Untersuchungen am Darm gesunder Hunde beschrieben werden (GERMAN et al. 1999). In dieser Untersuchung wird als Mittelwert im Bereich der Villusspitze die Anzahl der Becherzellen mit 3,6 je 100 Enterozyten angegeben. Mögliche Ursachen für diesen Unterschied wurden bereits im Kapitel 5.2.2. erörtert.

Neben den Enterozyten stellen verschiedene Entzündungszellen den Rest an der Gesamtzellzahl dar. Auffallend ist eine relativ weite Schwankungsbreite. Nicht alle

Zellarten sind in allen Präparaten vertreten. Die Zellart, die in allen Präparaten regelmäßig, wenn auch in unterschiedlichem Maße anzutreffen ist, sind die Lymphozyten.

Die zytologische Unterteilung in Bezug auf die Größe der Lymphozyten lässt noch nicht den Schluss auf ihre Funktion zu. Hier sind immunzytologische Verfahren notwendig, um einen genauen Vergleich zu ermöglichen. Vergleiche zwischen dieser zytologischen Untersuchung und den immunhistologischen Analysen von GERMAN et al. (1999) sind daher nur eingeschränkt möglich.

In der Zytologie der gesunden Darmschleimhaut liegt die Schwankungsbreite bei kleinen dunklen Lymphozyten, den intraepithelialen Leukozyten, zwischen 1,71 und 2,84 % (95%-Konfidenzintervall). Unabhängig von der Differenzierung ist das Vorkommen der intraepithelialen Leukozyten in dieser Untersuchung deutlich geringer, als es in immunhistologischen Untersuchungen angegeben wird (GERMAN et al. 1999). Mögliche Gründe wurden bereits in Kapitel 5.2.2. angesprochen.

Auch der direkte Vergleich für die Entzündungszellen der Lamina propria, den hellen Lymphozyten, neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Plasmazellen und Mastzellen ist nicht möglich. Vergleicht man allerdings das Verteilungsmuster, sind Ähnlichkeiten durchaus ersichtlich. Die prozentualen Angaben der Entzündungszellen der Lamina propria in Bezug auf die Gesamtzellzahl dieser zytologischen Untersuchung stellen sich wie folgt dar: Lymphozyten gesamt 11,75 % (95%-Konfidenzintervall: 4,36 - 7,79 %), eosinophile Granulozyten 0,49 % (95%-Konfidenzintervall: 0,006 - 0,09), Plasmazellen 0,1 % (95%-Konfidenzintervall: 0,006 - 0,03), Mastzellen 0,1 % (95%-Konfidenzintervall: 0,01 - 0,04) und neutrophile Granulozyten 0,14 % (95%-Konfidenzintervall: 0,002 - 0,03). Diese Ergebnisse entsprechen denen von GERMAN et al. (1999). Auch in der immunhistologischen Untersuchung nehmen die Lymphozyten (120, Gesamtzahl der unterschiedlichen Lymphozyten) den größten Anteil ein, während eosinophile Granulozyten (vier), Plasmazellen (eine) und Mastzellen (eine) demgegenüber deutlich seltener vorkamen. Neutrophile Granulozyten wurden in dieser Studie nicht erwähnt.

### 5.3 Altersunterschiede

Geprüft wurden Unterschiede zwischen den Altersgruppen bezüglich der Verteilung beziehungsweise des Vorkommens der Entzündungszellen im Dünndarm. Für die meisten Entzündungszellarten konnten keine altersabhängigen Unterschiede gefunden werden. Das Vorkommen der einzelnen Zellarten war überwiegend gleichmäßig ausgeprägt.

Bei den intraepithelialen Leukozyten ist in dieser Studie keine Altersabhängigkeit nachweisbar. Im Gegensatz dazu wird in der Literatur ein Anstieg der intraepithelialen Leukozyten im frühen Alter (bis zu vier Monaten) bei Hunden beschrieben (THOMAS u. ANDERSON 1982). Allerdings ist zu bemerken, dass die Hunde in dieser Untersuchung ausnahmslos älter als vier Monate waren. Ein direkter Vergleich wäre nur möglich, wenn die Altersgruppe der von (THOMAS u. ANDERSON 1982) entspräche.

Anders verhält es sich bei den großen granulierten Lymphozyten und den großen hellen Lymphozyten. Hier konnte festgestellt werden, dass beide Zellarten häufiger in der Gruppe der jungen Hunde (Gruppe 1) vorkommen. Dieses Ergebnis kann dadurch erklärt werden, dass die allgemeinen lymphoproliferativen Eigenschaften bei jungen und mittelalten Hunden deutlich ausgeprägter als bei älteren Tieren sind (GREELEY et al. 1996; STRASSER et al. 2000; GREELEY et al. 2001; TOMAN et al. 2002). Mit dem altersabhängigen Abfall der absoluten Anzahl der Lymphozyten kommt es zu einer Umverteilung innerhalb der Lymphozytenpopulation. Die Anzahl der B-Lymphozyten nimmt ab, während die T-Lymphozyten einen relativen Anstieg zeigen (GREELEY et al. 1996). Eine Differenzierung der Lymphozyten ist zytologisch mit einfachen Färbungen nicht möglich. Allgemein gilt, dass die B-Lymphozyten größer sind. Wendet man die Größe als Unterscheidungskriterium in dieser Untersuchung an, kann man den großen hellen Lymphozyten die Funktion als B-Lymphozyt zuschreiben. Damit lässt sich erklären, warum diese Zellart häufiger bei den jungen Hunden vorkommt als bei älteren.

Bezüglich der großen granulierten Lymphozyten ist die Absolutzahl deutlich größer in der Gruppe der jungen Hunde. Des Weiteren fällt innerhalb dieser Gruppe ein signifikant höheres Vorkommen dieser Zellart bei den Hunden bis zum Alter von zwölf Monaten auf. In der Literatur werden die großen granulierten Lymphozyten mit Typ-1-Hypersensitivitätsreaktionen und parasitären Infektionen in Zusammenhang

gebracht (RUITENBERG u. ELGERSMA 1979; RUITENBERG u. ELGERSMA 1980; DOUCH et al. 1986; BAERT 1989; HUNTLEY 1992; AKPAVIE u. PIRIE 1993; BALDWIN u. BECKER 1993; NARAMA et al. 1999).

Es ist zu vermuten, dass auch beim Hund ein Zusammenhang zwischen den großen granulierten Lymphozyten und parasitären Infektionen besteht. Eine aktuelle Endoparasitose ist in dieser Untersuchung durch parasitologische Kotuntersuchungen und einem ELISA bezüglich einer Giardien-Infektion soweit möglich ausgeschlossen worden. Dennoch müssen sich gerade Hunde in einem Alter bis zu einem Jahr mit intestinalen Parasiten bzw. mit parasitären Antigenen bei Erstinfektion intensiver auseinandersetzen, als ältere Tiere (VISCO et al. 1977; KIRKPATRICK 1988; BUGG et al. 1999; RUBEL et al. 2003; ITOH et al. 2003; RAMIREZ-BARRIOS et al. 2004).

In einer histologischen Studie bei Schafen wurde die Wirkung des Alters auf die großen granulierten Lymphozyten und die Schleimhautmastzellen im Darm nach gastrointestinaler Nematodeninfektion untersucht. Ähnlich dem Ergebnis der zytologischen Untersuchung beim Hund ist eine Altersabhängigkeit bei großen granulierten Lymphozyten und Schleimhautmastzellen festgestellt worden (DOUCH u. MORUM 1993). Die Anzahl der eosinophilen Granulozyten zeigte keine Altersabhängigkeit; wohl war sie aber höher als in der Kontrollgruppe ohne Infektion (DOUCH u. MORUM 1993). Der direkte Vergleich zwischen dieser histologischen Untersuchung bei Schafen und der zytologischen Untersuchung beim Hund ist insofern schwierig, da zum einen die Altersgruppen, die gegenüber gestellt wurden, nicht identisch sind. Zum anderen handelt es sich um unterschiedliche Spezies. Trotz allem erhärtet sich der Verdacht, dass das höhere Vorkommen der großen granulierten Lymphozyten beim jungen Hund mit der Auseinandersetzung mit parasitären Antigenen assoziiert werden kann.

#### **5.4 Schlussfolgerungen**

Ziel dieser Arbeit war die zytologische Beschreibung des physiologischen Zellbildes bei Abklatschpräparaten endoskopisch gewonnener Darmbiopsien von gesunden Hunden. Dazu sollten Zellpopulationen quantifiziert, Referenzbereiche erstellt und die Anordnung der Entzündungszellen im Verhältnis zum Darmepithel beschrieben

werden. Des Weiteren wurde überprüft, ob ein möglicher Einfluss des Alters auf die verschiedenen Entzündungszellen besteht.

Zusammenfassend lassen sich aus den in dieser Arbeit ermittelten Ergebnissen folgende Schlüsse ziehen:

1. Die endoskopische Biopsiegewinnung aus dem Darmkanal eignet sich zur Erstellung zytologischer Abklatschpräparate.
2. Die Abklatschtechnik ist eine schnelle Methode, zytologische Präparate guter Qualität aus dem Darmkanal herzustellen.
3. Die Qualität der Präparate ist in erster Linie von dem Gehalt an Monolayern, der Zellularität und dem Grad der Zellzerstörung abhängig.
4. Die prozentuale Verteilung der Entzündungszellen in der Darmschleimhaut des gesunden Hundes in dieser Arbeit zeigt in weiten Teilen eine hohe Korrelation mit Angaben aus der Literatur histologischer Studien.
5. Sezernierende Enterozyten und intraepitheliale Leukozyten werden in der Zytologie mengenmäßig unterschätzt. Eine gute Korrelation mit histologischen Untersuchungen bezüglich des Verteilungsmusters liegt bei den Zellen der Lamina propria vor.
6. Intraepitheliale Lymphozyten und große granulierte Lymphozyten liegen zwischen den Enterozyten, während die Lymphozyten der Lamina propria einzeln oder in einer Zelllage um einen Enterozytenverband angeordnet sind. Eosinophile und neutrophile Granulozyten, Plasmazellen und Mastzellen sind vorwiegend freiliegend ohne Kontakt zu den Enterozyten.
7. Die Enterozyten sind eine monomorphe Zellpopulation. Die Zellen besitzen einen dunkelblau-violetten Kern mit einem Kernkörperchen. In einigen Zellen treten Kernmembranverdickungen auf. Die Kernkörperchen haben meist eine runde Form und sind dunkelblau. Mitosen werden nicht gesehen. Die Enterozyten liegen im engen Zellverband, wobei die Zellgrenzen nicht oder nur schwer zu erkennen sind. Das Zytoplasma ist mittelblau und kann wenige Vakuolen enthalten.
8. Unter den Entzündungszellen dominieren die Lymphozyten, während die neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, Plasmazellen, Mastzellen, große granulierte Lymphozyten einen sehr kleinen Teil einnehmen.

9. Alterunterschiede können bei den großen granulierten Lymphozyten und den großen hellen Lymphozyten festgestellt werden. Diese Zellarten kommen vermehrt bei den jungen Hunden vor. Bei den großen granulierten Lymphozyten konnte sogar ein signifikanter Unterschied zwischen den Hunden mit einem Alter bis zu zwölf Monaten und den Hunden zwischen zwölf und 24 Monaten festgestellt werden.
10. weitere Altersunterschiede bei intraepithelialen Leukozyten und Lymphozyten der Lamina propria konnten in dieser Arbeit nicht nachgewiesen werden. Allerdings sind Unterschiede bei sehr jungen Hunden bis zu einem Alter von vier Monaten nach Angaben in der Literatur zu erwarten.
11. Die Ergebnisse dieser Untersuchung können als Basis für Diagnosekriterien von verschiedenen Darmerkrankungen des Hundes dienen.

## **6 ZUSAMMENFASSUNG**

Stella Fuchs

### **Die Evaluierung der zytologischen Untersuchung von endoskopisch gewonnenen Darmbiopsien beim gesunden Hund**

Klinik für Kleintiere der Veterinärmedizinischen Fakultät der Universität Leipzig

Eingereicht im März 2007

83 Seiten, 18 Abbildungen, 15 Tabellen, 151 Literaturangaben, Anhang

Schlüsselworte: Zytologie – Abklatschpräparate – Darmschleimhaut – Hund

In einer zytologischen Untersuchung werden Abklatschpräparate endoskopisch gewonnener Darmbiopsien gesunder Hunde untersucht. Die Beurteilung erfolgt an Hand zytomorphologischer und quantitativer Charakteristika der vorkommenden Zellarten. Für die einzelnen Zellarten wird eine mögliche Altersabhängigkeit überprüft. In die Untersuchung gelangen insgesamt 26 gesunde Hunde in drei Altersgruppen (Gruppe 1 = bis zu 24 Monate, n = 9, Ø Alter: 15,3 Monate; Gruppe 2 = 2-8 Jahre, n = 9, Ø Alter: 4,75 Jahre; Gruppe 3 = älter als 8 Jahre, n = 8, Ø Alter: 9,5 Jahre). Die Patienten werden nach der Anamnese, klinischen Untersuchung, Blut- und Kotuntersuchungen als klinisch gesund befundet. Tiere mit Anhaltspunkten für eine enterale Erkrankung oder mit Medikationen, vor allem Antibiotika, Kortikosteroiden oder nicht-steroidalen Antiphlogistika, werden von der Untersuchung ausgeschlossen.

Die endoskopische Biopsieentnahme erfolgt unter Allgemeinanästhesie. An vier Lokalisationen des Duodenums werden jeweils zwei Biopsien entnommen und daraus Abklatschpräparate hergestellt. Diese werden nach May-Grünwald-Giemsa gefärbt.

Zur Beurteilung kommen allgemeine zytologische Qualitätskriterien, wie das Vorkommen von Monolayern, freiem Kernprotein, der Zellularität sowie Kontaminationen. Weiterhin werden spezifische zytologische Kriterien des Zytoplasmas (Deutlichkeit der Zellgrenzen, Farbe des Zytoplasmas, Vakuolen im Zytoplasma) und des Kernes (Mitosen, Anzahl der Kerne pro Zelle, Chromatinstruktur, Kernmembranverdickung, Färbung von Kern und Nukleoli, Anzahl Nukleoli) bei den Enterozyten



sowie das Vorkommen von Malignitätskriterien bewertet. Es erfolgt eine Differenzierung und Quantifizierung der in der Darmschleimhaut vorkommenden Zellpopulationen. Dabei werden die Entzündungszellen in Relation zu den Enterozyten prozentual erfasst.

Mit der angewandten Abklatschtechnik werden auswertbare zytologische Präparate hergestellt. Die Qualität ist in erster Linie vom Gehalt an Monolayern, der Zellularität und dem Grad der Zellzerstörung abhängig.

Enterozyten sind eine einheitliche Zellpopulation im festen Verband. Zwischen den Enterozyten und um den Enterozytenverband liegen Entzündungszellen mit unterschiedlichem Verteilungsmuster. Dunkle Lymphozyten befinden sich vor allem zwischen den Enterozyten. Sie nehmen an der Gesamtzellzahl (95%-Konfidenzintervall 1,71 - 2,84 %) einen relativ hohen Anteil ein. Den größten Anteil bilden helle Lymphozyten. Diese können in kleine (95%-Konfidenzintervall 0,64 - 1,53 %), mittelgroße (95%-Konfidenzintervall 1,85 - 3,05 %) und große Formen (95%-Konfidenzintervall 0,14 - 0,26 %) differenziert werden. Im Gegensatz zu dunklen Lymphozyten sind sie vor allem um einen Epithelverband herum angeordnet. Andere Entzündungszellen, wie neutrophile (95%-Konfidenzintervall 0,002 - 0,03 %) und eosinophile (0,006 - 0,09 %) Granulozyten, Plasmazellen (95%-Konfidenzintervall 0,006 - 0,003 %), Mastzellen (95%-Konfidenzintervall 0,01 - 0,04 %) und auch die großen granulierten Lymphozyten (95%-Konfidenzintervall 0,02 - 0,11 %) sind in der Regel ohne Kontakt zu den Enterozyten im zytologischen Präparat angeordnet.

Ein Alterseinfluss kann bei großen granulierten Lymphozyten und großen hellen Lymphozyten beobachtet werden. Beide Zellarten kommen bei jungen Hunden gehäuft vor. Insbesondere bei Hunden in einem Alter von bis zu zwölf Monaten sind große granulierten Lymphozyten häufiger zu erkennen.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigen, dass die Entzündungszellen innerhalb und zwischen den Altersgruppen weitgehend homogen verteilt sind. Es können Referenzbereiche erstellt werden, die in weiteren Untersuchungen als Basis für das Erstellen spezifischer Diagnosekriterien für verschiedene Darmerkrankungen des Hundes dienen können.

## 7 SUMMARY

Stella Fuchs

### **Evaluation of cytologic analysis of endoscopically obtained intestinal biopsies of healthy dogs**

Department of Small Animal Medicine, Faculty of Veterinary Medicine, University of Leipzig

Submitted in March 2007

83 pages, 18 figures, 15 tables, 151 references, appendix

Keywords: cytology – squash preparation – intestinal mucosa – dog

In this cytologic study morphologic and quantitative characteristics of the cellular composition of squash preparations of endoscopically obtained intestinal biopsies were acquired.

In a total of 26 healthy dogs in three different age groups, the influence of age was proven (Group 1 = less than 24 months old, n = 9, Ø age: 15.3 months; Group 2 = 2-8 years old, n = 9, Ø age: 4.75 years; Group 3 = over 8 years old, n = 8, Ø age: 9.5 years). The health status was recorded (anamnestic data, clinical examination, and blood and faeces status). Animals with signs of intestinal disease or premedication with antibiotics, corticosteroids or nonsteroidal anti-inflammatory drugs were excluded from the study.

Each dog was examined endoscopically under general anaesthesia, from four locations in the duodenum two samples were obtained per location. The squash preparations were stained with the May-Grünwald-Giemsa technique.

In a first step the quality of the smears was assessed: presence of monolayer, free nucleus protein, cellularity and contaminations. Further specific cytologic criteria of the cytoplasm (cell border, colour, vacuolation) and of the nucleus (mitose rate, nuclei pro cell, chromatin pattern, thickening of nucleusmembran, colour of nucleus and nucleoli) of the enterocytes were recorded. Samples were checked for criteria of malignancy.

The cell population was quantified and categorized. The relation between inflammatory cells (neutrophilic and eosinophilic granulocytes, dark and bright lymphocytes, large granular lymphocytes, plasma cells, mast cells) and enterocytes was determined.

The obtained cytologic squash preparations were of diagnostic quality. The quality was primarily influenced by the amount of monolayers, the cellularity and the degree of cell destruction.

Enterocytes can be considered as a uniform cell population with a compact formation. Inflammatory cells with varying distribution patterns are positioned between the enterocytes and in the periphery of the clusters.

Dark lymphocytes are predominantly located between the enterocytes. The percentage of dark lymphocytes within the overall cell population is relatively high (95%-confidenceinterval 1.71 - 2.84 %). However, the highest incidence account for bright lymphocytes was small (95%-confidenceinterval 0.64 - 1.53 %), intermediate (95%-confidenceinterval 1.85 - 3.05 %) and large cells (95%-confidenceinterval 0.14 - 0.26 %) could be distinguished. In comparison to the dark lymphocytes these cells are located in the periphery of epithelial clusters. Other inflammatory cells, such as neutrophilic granulocytes (95%-confidenceinterval 0.002 - 0.03 %), eosinophilic granulocytes (0.006 - 0.09 %), plasma cells (0.006 - 0.03 %) and mast cells (0.01 - 0.04 %) are regularly without any contact to the enterocytes.

A significant correlation to age was shown regarding the large granular lymphocytes (95%-confidenceinterval 0.02 - 0.11 %) and the large bright lymphocytes. Both cell types occur more frequently in younger dogs. In dogs less than 12 months of age large granular lymphocytes could be found more often.

The study results reveal that inflammatory cells are homogeneously distributed within and between age groups. For the different cell types age related reference values were established. These established reference values may provide a baseline for defining specific diagnostic criteria to differentiate intestinal diseases in dogs.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Akpavie So, Pirie Hm. The Globule Leucocyte: Morphology, Origin, Function And Fate, A Review. *Anat Histol Embryol.* 1989; 18: 87-95.
- Akpavie So, Pirie Hm. Globule Leukocytes And Bovine Parasitic Bronchitis. *Anat Histol Embryol.* 1993; 22: 144-50.
- Andreasen Cb, Jergens Ae, Meyer Dj. Oral Cavity, Gastrointestinal Tract And Associated Tissue. In: Raskin Re, Meyer Dj (Hrsg.): *Atlas Of Canine And Feline Cytology.* Philadelphia: Wb Saunders; 2000. 207-29.
- Austin L, Dobbins W. Intraepithelial Leucocytes Of The Intestinal Mucosa In Normal Man And In Whipples's Disease. *Dig Dis Sci.* 1982; 27: 311-320.
- Baert J. Ultrastructure Of Globule Leucocytes Isolated From Rat Tracheal Epithelium. *J Submicrosc Cytol Pathol.* 1989; 21: 765-769.
- Baert J, Frederix M. Globule Leukocytes In The Respiratory Epithelium Of Human Upper Airways: An Ultrastructural Study. *Anat Rec.* 1985; 212: 143-152.
- Baker R, Lumsden Jh. The Gastrointestinal Tract. In: Baker R, Lumsden Jh (Hrsg.): *Color Atlas Of Cytology Of The Dog And Cat.* St. Louis: Cv Mosby; 2000. 177-83.
- Baldwin F, Becker Ab. Bronchoalveolar Eosinophilic Cells In A Canine Model Of Asthma: Two Distinctive Populations. *Vet Pathol.* 1993; 30: 97-103.
- Barker Ik, Van Dreumel Aa, Palmer N. The Alimentary System. In: Jubb Kvf, Kennedy Pc, Palmer N (Hrsg.): *Pathology Of Domestic Animals.* San Diego: Academic Press; 1993. 1-318.
- Barlough Je, Jacobson Rh, Scott Fw. The Immunoglobulins Of The Cat. *Cornell Vet.* 1981; 71: 397-407.
- Barton C. Cytologic Diagnosis Of Cutaneous Neoplasia: "An Algorithmic Approach". *Comp Contin Educ Pract Vet.* 1987; 9: 20-33.
- Batt Rm, Barnes A, Rutgers Hc, Carter Sd. Relative Iga Deficiency And Small Intestinal Bacterial Overgrowth In German Shepherd Dogs. *Res Vet Sci.* 1991; 50: 106-11.
- Befus D, Bienenstock J. Induction And Expression Of Mucosal Immune Responses And Inflammation To Parasitic Infections. *Contemp Top Immunobiol.* 1984; 12: 71-108.
- Befus Ad, Spencer Ja, Mcdermott Mr, Mclaughlin B, Bienenstock J. Isolation And Characteristics Of Small Intestinal Lamina Propria Cells From Normal And Nematode (*Nippostrongylus Brasiliensis*)-Infected Rats. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1984; 75: 345-50.

- Benyacoub J, Czarnecki-Maulden GI, Cavadini C, Sauthier T, Anderson Re, Schiffrin Ej Et Al. Supplementation Of Food With Enterococcus Faecium (Sf68) Stimulates Immune Functions In Young Dogs. J Nutr. 2003; 133: 1158-62.
- Bienenstock J, Befus D. Gut- And Bronchus-Associated Lymphoid Tissue. Am J Anat. 1984; 170: 437-45.
- Blakemore Jc. Gastrointestinal Allergy. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1994; 24: 655-95.
- Boon Gd, Rebar Ah, Denicola Db. A Cytologic Comparison Of Romanowsky Stains And Papanicolaou-Type Stains I. Introduction, Methodology And Cytology Of Normal Tissues. Vet Clin Pathol. 1982; 11: 22-30.
- Bugg Rj, Robertson Id, Elliot Ad, Thompson Rc. Gastrointestinal Parasites Of Urban Dogs In Perth, Western Australia. Vet J. 1999; 157: 295-301.
- Burck H-C. Färbemethoden. In: Burck H-C (Hrsg.): Histologische Technik. 6 Aufl. Stuttgart: Georg Thieme; 1973. 129-31.
- Carman Ps, Ernst Pb, Rosenthal Kl, Clark Da, Befus Ad, Bienenstock J. Intraepithelial Leukocytes Contain A Unique Subpopulation Of Nk-Like Cytotoxic Cells Active In The Defense Of Gut Epithelium To Enteric Murine Coronavirus. J Immunol. 1986; 136: 1548-53.
- Clercx C, Wallon J, Gilbert S, Et Al., Adams S. Imprint And Brush Cytology In The Diagnosis Of Canine Intranasal Tumours. J Small Anim Pract. 1996; 37: 423-7.
- Clinkenbeard Kd, Cowell RI. Zytologische Merkmale Maligner Neoplasien. Waltham Focus. 1994; 4: 3-8.
- Coles S, Singh A, Eyre P. Morphology Of Globule Leucocyte From Bovine Bronchopulmonary Lavage. Acta Anat (Basel). 1987; 129: 155-8.
- Couto Cg, Rutgers Hc, Sherding Rg, Rojko J. Gastrointestinal Lymphoma In 20 Dogs. A Retrospective Study. J Vet Intern Med. 1989; 3: 73-8.
- Day Mj, Hall Ej. Immune-Mediated Alimentary And Respiratory Disease. In: Day Mj (Hrsg.): Clinical Immunology Of The Dog & Cat. London: Manson Publishing Ltd.; 1999. 146-61.
- De Nicola Db, Reagan Wj. Using Cytology In The Diagnosis Of Cancer. In: Morrison Wb (Hrsg.): Cancer In Dogs And Cats. Baltimore: Williams & Wilkins; 1998. 79-94.
- Debongnie Jc, Mairesse J, Donnay M, Dekoninck X. Touch Cytology. A Quick, Simple, Sensitive Screening Test In The Diagnosis Of Infections Of The Gastrointestinal Mucosa. Arch Pathol Lab Med. 1994; 118: 1115-8.
- Deplazes P, Thompson Rc, Constantine Cc, Penhale Wj. Primary Infection Of Dogs With Echinococcus Granulosus: Systemic And Local (Peyer's Patches) Immune Responses. Vet Immunol Immunopathol. 1994; 40: 171-84.

- Donaldson Ll, Leib Ms, Boyd C, Burkholder W, Sheridan M. Effect Of Preanesthetic Medication On Ease Of Endoscopic Intubation Of The Duodenum In Anesthetized Dogs. *Am J Vet Res.* 1993; 54: 1489-95.
- Douch Pg, Harrison Gb, Elliott Dc, Buchanan Ll, Greer Ks. Relationship Of Gastrointestinal Histology And Mucus Antiparasite Activity With The Development Of Resistance To Trichostrongyle Infections In Sheep. *Vet Parasitol.* 1986; 20: 315-31.
- Douch Pg, Morum Pe. The Effect Of Age On The Response Of Romney Sheep To Gastrointestinal Nematodes During Grazing. *Int J Parasitol.* 1993; 23: 651-5.
- Drasar Bs, Hill Mj. Human Intestinal Flora. In: Anon. Human Intestinal Flora. London: Academic Press; 1974.
- Duncan Jr, Prasse Kw. Cytologic Examination Of The Skin And Subcutis. *Vet Clin North Am.* 1976; 6: 637-45.
- Egberts Hja, Brinkhoff Mgm, Mouwen Jmvm, Van Dijk Je, Koninkx Jfig. Biology And Pathology Of The Intestinal M Cell. *Vet Q.* 1985; 7: 333-6.
- Elwood C, Garden O, Manners H, Hamblin A, Batt R. Altered Populations Of T-Lymphocytes In The Jejunal Mucosa Of Irish Setter Dogs With Gluten Sensitive Enteropathy. *Gastroenterology.* 1996; 110: 903.
- Elwood C, Hamblin A, Batt Rm. Quantitative And Qualitative Immunohistochemistry Of T Cells Subsets And Mhc Class Ii Expression In Canine Small Intestine. *Vet Immunol Immunopathol.* 1997; 58: 195-207.
- Evans He, Christensen Gc. The Alimentary Canal. In: Anon. Miller's Anatomy Of The Dog. Philadelphia: Wb Saunders; 1979. 455-506.
- Faldyna M, Sinkora J, Knotigova P, Leva L, Toman M. Lymphatic Organ Development In Dogs: Major Lymphocyte Subsets And Activity. *Vet Immunol Immunopathol.* 2005; 104: 239-47.
- Fasske E. Lehrbuch Der Histologischen Technik. Berlin, München: 1964.
- Ferguson A, Parrott D. The Effect Of Antigen Deprivation On Thymus-Dependent And Thymus-Independent Lymphocytes In The Small Intestine Of The Mouse. *Clinical And Experimental Medicine.* 1972; 12: 477-88.
- Finn Jp, Schwartz Lw. A Neoplasm Of Globule Leucocytes In The Intestine Of A Cat. *J Comp Pathol.* 1972; 82: 323-6.
- Fiocchi C, Youngman Kr, Farmer Rg. Immunoregulatory Function Of Human Intestinal Mucosa Lymphoid Cells: Evidence For Enhanced Suppressor Cell Activity In Inflammatory Bowel Disease. *Gut.* 1983; 24: 692-701.
- Foster Ap, Knowwles Tg, Hotston Moore A, Cousins Pdg, Day Mj, Hall Ej. Serum Ige Und Igg Responses To Food Antigens In Normal And Atopic Dogs, And Dogs With Gastrointestinal Disease. *Vet Immunol Immunopathol.* 2003; 92: 113-24.

- Fujihashi K, Mcghee Jr. Mucosal Immunity And Tolerance In The Elderly. *Mech Ageing Dev.* 2004; 125: 889-98.
- Garden O. Gastrointestinal Immunity In Health And Disease: On Overview. *Proc 19 Th Acvim Denver 2001a*; 714-5.
- Garden O. Gluten-Sensitive Enteropathy. *Proc 19 Th Acvim Denver 2001b*; 716-7.
- German Aj. The Mucosal Immune System, And The Mucosal Immune Response In Dogs With Chronic Enteropathies. *Proc 19 Th Acvim Denver 2001*; 634-6.
- German Aj, Hall Ej, Day Mj. Analysis Of Leucocyte Subsets In The Canine Intestine. *J Comp Pathol.* 1999; 120: 129-45.
- German Aj, Hall Ej, Day Mj. Immune Cell Populations Within The Duodenal Mucosa Of Dogs With Enteropathies. *J Vet Intern Med.* 2001; 15: 14-25.
- Gorbach Sl. Intestinal Microflora. *Gastroenterology.* 1971; 60: 1110-29.
- Gorbach Sl. Probiotics And Gastrointestinal Health. *Am J Gastroenterol.* 2000; 95: 2-4.
- Gorbach Sl, Nahas L, Lerner Pi, Weinstein L. Studies Of Intestinal Microflora. I. Effects Of Diet, Age, And Periodic Sampling On Numbers Of Fecal Microorganisms In Man. *Gastroenterology.* 1967; 53: 845-55.
- Greeley Eh, Ballam Jm, Harrison Jm, Kealy Rd, Lawler Df, Segre M. The Influence Of Age And Gender On The Immune System: A Longitudinal Study In Labrador Retriever Dogs. *Vet Immunol Immunopathol.* 2001; 82: 57-71.
- Greeley Eh, Kealy Rd, Ballam Jm, Lawler Df, Segre M. The Influence Of Age On The Canine Immune System. *Vet Immunol Immunopathol.* 1996; 55: 1-10.
- Guilford Wg. Upper Gastrointestinal Endoscopy. *Vet Clin North Am Small Anim Pract.* 1990; 20: 1209-27.
- Guilford Wg, Strombeck Dr. Chronic Gastric Diseases. In: Guilford Wg, Center Sa, Strombeck Dr (Hrsg.): *Strombeck's Small Animal Gastroenterology.* 3. Aufl. Philadelphia: Wb Saunders; 1996. 275-302.
- Hall Ej, Simpson Kw. Disease Of The Small Intestine. In: Ettinger Sj, Feldman Ec (Hrsg.): *The Textbook Of Veterinary Internal Medicine.* 5. Aufl. Philadelphia: Wb Saunders; 2000. 1182-237.
- Hall Ri, Macwilliams Ps. The Cytologic Examination Of Cutaneous And Subcutaneous Masses. *Semin Vet Med Surg (Small Anim).* 1988; 3: 94-108.
- Hanauer Sb, Kraft Sc. Intestinal Immunology. In: Berk Je, Haubrich Ws, Kalser Mh (Hrsg.): *Gastroenterology.* Philadelphia: Wb Saunders; 1985. 1607-31.
- Happe Rp. Gastrointestinal Endoscopy In The Dog. *Vet Q.* 1985; 7: 231-4.

- Happe Rp, Van Der Gaag I. Endoscopic Examination Of The Esophagus, Stomach And Duodenum In The Dog. J Am Anim Hosp Assoc. 1983; 19: 197-206.
- Harty Rf, Leibach Jr. Immune Disorders Of The Gastrointestinal Tract And Liver. Med Clin North Am. 1985; 69: 675-704.
- Hasan M, Hay F, Sircus W, Ferguson A. Nature Of The Inflammatory Cell Infiltrate In Duodenitis. J Clin Pathol. 1983; 36: 280-8.
- Hees H, Tschudi P. Blut Und Knochenmark. In: Mosimann W, Kohler T (Hrsg.): Zytologie, Histologie Und Mikroskopische Anatomie Der Haussäugetiere. 1. Aufl. Berlin Und Hamburg: Paul Parey; 1990. 98-111.
- Heyworth Mf, Owen Rl, Jones Al. Comparison Of Leukocytes Obtained From The Intestinal Lumen Of Giardia-Infected Immunocompetent Mice And Nude Mice. Gastroenterology. 1985; 89: 1360-5.
- Hitt Me. Biopsy Of The Gastrointestinal Endoscopy. In: Bonagura Jd (Hrsg.): Kirk's Current Veterinary Therapy Xi. 11. Aufl. Philadelphia: Wb Saunders; 1995. 675-8.
- Honor Dj, De Nicola Db, Turek Jj, Render Ja, Serra Da. A Neoplasm Of Globule Leukocytes In A Cat. Vet Pathol. 1986; 23: 287-92.
- Huntley Jf. Mast Cells And Basophils: A Review Of Their Heterogeneity And Function. J Comp Pathol. 1992; 107: 349-72.
- Itoh N, Muraoka N, Aoki M, Itagaki T. Prevalence Of Strongyloides Spp. Infection In Household Dogs. Kansenshogaku Zasshi. 2003; 77: 430-5.
- James Sp. The Gastrointestinal Mucosal Immune System. Dig Dis. 1993; 11: 146-56.
- Jergens Ae. Inflammatory Bowel Disease - Current Perspective. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1999; 29: 501-21.
- Jergens Ae. The Role Of Antibiotics In Gastrointestinal Tract Disease. Proc 19 Th Acvim. Denver 2001; 60-1.
- Jergens Ae. Inflammatory Bowel Disease (Ibd): Development In The Area Of Diagnosis And Treatment. Tijdschr Diergeneesk. 2002; 127: 300-1.
- Jergens Ae, Moore Fm, Haynes Js, Miles Kg. Idiopathic Inflammatory Bowel Disease In Dogs And Cats: 84 Cases (1987-1990). J Am Vet Med Assoc. 1992; 201: 1603-8.
- Jergens Ae, Andreasen Cb, Hagemoser Wa. The Use Of Endoscopic Cytology In The Diagnosis Of Gastrointestinal Disease. J Vet Intern Med. 1997; 11: 115.
- Jergens Ae, Andreasen Cb, Hagemoser Wa, Ridgway J, Campbell Kl. Cytologic Examination Of Exfoliative Specimens Obtained During Endoscopy For Diagnosis Of Gastrointestinal Tract Disease In Dogs And Cats. J Am Vet Med Assoc. 1998; 213: 1755-9.



- Jergens Ae, Andreasen Cb, Miles Kg. Gastrointestinal Endoscopic Exfoliative Cytology: Techniques And Clinicla Application. Compend Contin Educ Pract Vet. 2000; 22: 941-51.
- Johnson Gf, Twedt Dc. Endoscopy And Laparoscopy In The Diagnosis And Management Of Neoplasia In Small Animals. Vet Clin North Am. 1977; 7: 77-92.
- Jones Bd. Endoscopy Of The Lower Gastrointestinal Tract. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1990; 20: 1229-1242
- Jones Bd, Gross Me. Introduction To Endoscopy. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1990; 20: 1199-1208
- Kato H, Fujihashi K, Kato R, Dohi T, Fujihashi K, Hagiwara Y Et Al. Lack Of Oral Tolerance In Aging Is Due To Sequential Loss Of Peyer's Patch Cell Interactions. Int Immunol. 2003; 15: 145-58.
- Kawabata S, Boyaka Pn, Coste M, Fujihashi K, Yamamoto M, Mcghee Jr Et Al. Intraepithelial Lymphocytes From Villus Tip And Crypt Portions Of The Murine Small Intestine Show Distinct Characteristics. Gastroenterology. 1998; 115: 866-73.
- Kealy Rd, Lawler Df, Ballam Jm, Mantz Sl, Biery Dn, Greeley Eh Et Al. Effects Of Diet Restriction On Life Span And Age-Related Changes In Dogs. J Am Vet Med Assoc. 2002; 220: 1315-20.
- Kearns Rj, Hayek Mg, Turek Jj, Meydani M, Burr Jr, Greene Rj Et Al. Effect Of Age, Breed And Dietary Omega-6 (N-6): Omega-3 (N-3) Fatty Acid Ratio On Immune Function, Eicosanoid Production, And Lipid Peroxidation In Young And Aged Dogs. Vet Immunol Immunopathol. 1999; 69: 165-83.
- Kennis Ra. Food Allergies: Update Of Pathogenesis, Diagnoses And Management. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 2006; 36: 175-84.
- Kirkpatrick Ce. Epizootiology Of Endoparasitic Infections In Pet Dogs And Cats Presented To A Veterinary Teaching Hospital. Vet Parasitol. 1988; 30: 113-24.
- Kraft W. Endoskopie Des Gastrointestinaltraktes Bei Hund Und Katze. In: Kraft W, (Hrsg.): Tierärztliche Endoskopie. Stuttgart: Schattauer; 1993. 68-96.
- Langkamp-Henken B, Glezer Ja, Kudsk Ka. Immunologic Structure And Function Of The Gastrointestinal Tract. Nutr Clin Pract. 1992; 7: 100-8.
- Leonhardt H. In: Leonhardt H (Hrsg.): Histologie, Zytologie Und Mikroanatomie Des Menschen. 8. Aufl. New York: Thieme; 1990.
- Liebich H-G. Blut Und Blutzellbild. In: Liebich H-G (Hrsg.): Funktionelle Histologie. Stuttgart: Schattauer; 1990a. 114-25.
- Liebich H-G. Verdauungsapparat. In: Liebich H-G (Hrsg.): Funktionelle Histologie. Stuttgart: Schattauer; 1990b. 170-90.

- Malstrom C, James S. Inhibition Of Murine Splenic And Mucosal Lymphocyte Function By Enteric Bacterial Products. *Infect Immun.* 1998; 66: 3120-7.
- Manhart N, Vierlinger K, Bergmeister H, Boltz-Nitulescu G, Spittler A, Roth E. Influence Of Short-Term Protein Malnutrition Of Mice On The Phenotype And Costimulatory Signals Of Lymphocytes From Spleen And Peyer's Patches. *Nutrition.* 2000; 16: 197-201.
- Mannick E, Udall Jn, Jr. Neonatal Gastrointestinal Mucosal Immunity. *Clin Perinatol.* 1996; 23: 287-304.
- Massimino S, Kearns Rj, Loos Km, Burr J, Park Js, Chew B Et Al. Effects Of Age And Dietary Beta-Carotene On Immunological Variables In Dogs. *J Vet Intern Med.* 2003; 17: 835-42.
- Matz Me, Leib Ms, Monroe We, Davenport Dj, Nelson Lp, Kenny Je. Evaluation Of Atropine, Glucagon, And Metoclopramide For Facilitation Of Endoscopic Intubation Of The Duodenum In Dogs. *Am J Vet Res.* 1991; 52: 1948-50.
- Messow C, Hermanns W. Entzündung. In: Kitt T (Hrsg.): *Lehrbuch Der Allgemeinen Pathologie.* 10 Aufl. Stuttgart: Ferdinand Enke; 1990. 285-308.
- Monroe We, Leib Ms, Matz Me, Davenport Dj, Nelson Lp, Kenny Je. Evaluation Of Metoclopramide Hydrochloride As An Aid For Passage Of A Flexible Endoscope Into The Duodenum Of Dogs. *Am J Vet Res.* 1992; 53: 149-52.
- Mosimann W, Kohler T. Verdauungsorgane. In: Mosimann W, Kohler T (Hrsg.): *Zytologie, Histologie Und Mikroskopische Anatomie Der Haussäugetiere.* Berlin: Paul Parey; 1990. 162-73.
- Narama I, Ozaki K, Matsushima S, Matsuura T. Eosinophilic Gastroentero-Colitis In Iron Lactate-Overloaded Rats. *Toxicol Pathol.* 1999; 27: 318-24.
- O'donoghue Jm, Horgan Pg, O'donohoe Mk, Byrne J, O'hanlon Dm, Mcguire M Et Al. Adjunctive Endoscopic Brush Cytology In The Detection Of Upper Gastrointestinal Malignancy. *Acta Cytol.* 1995; 39: 28-34.
- O'rourke Lg. Cytologic Technics: Sampling, Slide Preparation, Staining. *Mod Vet Pract.* 1983; 64: 185-9.
- Orell S. *Punktionszytologie, Handbuch Und Atlas.* Stuttgart, New York: Georg Thieme; 1999.
- Perman V, Alsaker Rd, Rijs Rc. *Cytology Of The Dog And The Cat.* Am Anim Hop Ass, South Bend 1979.
- Ramirez-Barrios Ra, Barboza-Mena G, Munoz J, Angulo-Cubillan F, Hernandez E, Gonzalez F Et Al. Prevalence Of Intestinal Parasites In Dogs Under Veterinary Care In Maracaibo, Venezuela. *Vet Parasitol.* 2004; 121: 11-20.
- Rebar Ah. In: Rebar Ah, Editor. *Handbook Of Veterinary Cytology.* St. Louis: Ralson Purina Co; 1980a.

- Rebar Ah. Diagnostic Cytology In Veterinary Practice: Current Status And Interpretive Principles. In: Bonagura Jd (Hrsg.): Kirk's Current Veterinary Therapy VII. 7. Aufl. Philadelphia: Wb Saunders; 1980b. 16-27.
- Rebar Ah, Boon Gd, Denicola Db. A Cytologic Comparison Of Romanowsky Stains And Papanicolaou-Type Stains II. Cytology Of Inflammatory And Neoplastic Lesions. Vet Clin Pathol. 1982; 11: 16-25.
- Roth L, Leib Ms, Davenport Dj, Monroe We. Comparisons Between Endoscopic And Histologic Evaluation Of The Gastrointestinal Tract In Dogs And Cats: 75 Cases (1984-1987). J Am Vet Med Assoc. 1990a; 196: 635-8.
- Roth L, Walton Am, Leib Ms, Burrows Cf. A Grading System For Lymphocytic Plasmacytic Colitis In Dogs. J Vet Diagn Invest. 1990b; 2: 257-62.
- Rubel D, Zunino G, Santillan G, Wisnivesky C. Epidemiology Of Toxocara Canis In The Dog Population From Two Areas Of Different Socioeconomic Status, Greater Buenos Aires, Argentina. Vet Parasitol. 2003; 115: 275-86.
- Ruitenbergh Ej, Elgersma A. Response Of Intestinal Globule Leucocytes In The Mouse During A Trichinella Spiralis Infection And Its Independence Of Intestinal Mast Cells. Br J Exp Pathol. 1979; 60: 246-51.
- Ruitenbergh Ej, Elgersma A. Study Of The Kinetics Of Globule Leucocytes In The Intestinal Epithelium Of Rats After Single Or Double Infection With Trichinella Spiralis. Br J Exp Pathol. 1980; 61: 285-90.
- Sheffy Be, Williams Aj. Nutrition And The Aging Animal. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1981; 11: 669-75.
- Simon Gl, Gorbach Sl. Intestinal Flora And Gastrointestinal Function. In: Johnson Lr (Hrsg.): Physiology Of The Gastrointestinal Tract. New York: Raven Press; 1987. 1729-47.
- Simpson Jm, Martineau B, Jones We, Ballam Jm, Mackie Ri. Characterization Of Fecal Bacterial Populations In Canines: Effects Of Age, Breed And Dietary Fiber. Microb Ecol. 2002; 44: 186-97.
- Smith Hw. Observations On The Flora Of The Alimentary Tract Of Animals And Factors Affecting Its Composition. J Pathol Bacteriol. 1965; 89: 95-122.
- Sonea Im, Jergens Ae, Sacco Re, Niyo Y, Merten E, Kauffman Lk Et Al. Flow Cytometric Analysis Of Colonic And Small Intestinal Mucosal Lymphocytes Obtained By Endoscopic Biopsy In The Healthy Dog. Vet Immunol Immunopathol. 2000; 77: 103-19.
- Soost Hj. In: Soost Hj (Hrsg.): Lehrbuch Der Klinischen Zytodiagnostik. Stuttgart: Georg Thieme; 1978.
- Steward Thm, Hetenyi C, Rowsell H, Orizyga M. Ulcerative Enterocolitis In Dogs Induced By Drugs. J Pathol. 1980; 131: 363-78.

- Stirtzinger T. The Cytology Diagnosis Of Mesenchymal Tumors. Semin Vet Med Surg. 1988; 3: 157-66.
- Stockhaus C, Werner Hg. Die Exfoliativzytologie Des Harnes: Eine Hilfreiche Methode In Der Diagnostik Von Tumoren Des Harntraktes. Kleintierpraxis. 1996; 41: 553-60.
- Stockhaus C, Teske E. Die Zytologische Diagnostik Von Umfangsvermehrungen Der Haut, Unterhaut Und Mundhöhle Bei Hund Und Katze. Kleintierpraxis. 1999; 44: 421-34.
- Stockhaus C, Teske E, Van Den Ingh T, Rothuizen J. The Influence Of Age On The Cytology Of The Liver In Healthy Dogs. Vet Pathol. 2002; 39: 154-8.
- Stockhaus C, Schoon Ha, Grevel V, Oechtering G, Teske E. Diagnostische Aussagekraft Der Zytologie Für Den Nachweis Von Weichteilsarkomen Bei Hund Und Katze. Tierärztliche Praxis. 2003; 31: 148-53.
- Stockhaus C, Taprogge B, Schoon Ha, Scharvogel S, Grevel V, Oechtering G Et Al. Zur Intraoperativen Zytologischen Diagnostik Bei Hund Und Katze. Tierärztliche Praxis Ausgabe Kleintiere Heimtiere. 2004; 32: 140-6.
- Strasser A, Teltscher A, May B, Sanders C, Niedermüller H. Age-Associated Changes In The Immune System Of German Shepherd Dogs. J Vet Med A Physiol Pathol Clin Med. 2000; 47: 181-92.
- Tammena I, Rudolph R, Stockhaus C, Werner H, Brunnberg L. Zur Zytologischen Untersuchung Kutaner Fibrosarkome Beim Hund. Kleintierpraxis. 2004; 49: 683-8.
- Tams Tr. In: Tams Tr (Hrsg.): Small Animal Endoscopy. St. Louis: Cv Mosby; 1990.
- Targan Sr, Kagnoff Mf, Brogan Md, Shanahan F. Immunologic Mechanisms In Intestinal Diseases. Ann Intern Med. 1987; 106: 853-70.
- Thomas J, Anderson Nv. Intraepithelial Lymphocytes In The Small Intestinal Mucosa Of Conventionally Reared Dogs. Am J Vet Res. 1982; 42: 200-3.
- Toman M, Faldyna M, Knotigova P, Pokorova D, Sinkora J. Postnatal Development Of Leukocyte Subset Composition And Activity In Dogs. Vet Immunol Immunopathol. 2002; 87: 321-6.
- Tyler D, Cowell Rl, Meinkoth Jh. Cutaneous And Subcutaneous Lesions: Masses, Cysts, Ulcers And Fistulous Tracts. In: Cowell Rl, Tyler D (Hrsg.): Diagnostic Cytology Of The Dog And Cat. Goleta, California: Am. Vet. Publications; 1989. 20-45.
- Ueberschär S. Zytopathologie Und Zytologische Diagnostik - Einführung. Spezialtagung Der Dvg - Fg Kleintierkrankheiten, Arbeitsgruppe Nord 1996; 5-11.

- Van Der Gaag I, Happe Rp. The Histological Appearance Of Peroral Small Intestinal Biopsies In Clinical Healthy Dogs And Dogs With Chronic Diarrhea. J Vet Med. 1990; 37: 401-16.
- Van Der Heijden Pj, Stok W. Improved Procedure For The Isolation Of Functionally Active Lymphoid Cells From The Murine Intestine. J Immunol Methods. 1987; 103: 161-7.
- Van Garderen E, Van Dijk J, Van Den Ingh T. The Biology And Pathobiology Of The Intestinal Intraepithelial Lymphocyte: A Review Of The Literature. Vet Q. 1991; 13: 225-32.
- Visco Rj, Corwin Rm, Selby La. Effect Of Age And Sex On The Prevalence Of Intestinal Parasitism In Dogs. J Am Vet Med Assoc. 1977; 170: 835-7.
- Wang Hh, Jonasson Jg, Ducatman Bs. Brushing Cytology Of The Upper Gastrointestinal Tract. Obsolete Or Not? Acta Cytol. 1991; 35: 195-8.
- Weiss E. Entzündung. In: Stünzi H, Weiss E (Hrsg.): Allgemeine Pathologie Für Tierärzte Und Studierende Der Tiermedizin. 8. Aufl. Berlin Und Hamburg: Paul Parey; 1990. 230-71.
- Wellman Ml. The Cytologic Diagnosis Of Neoplasia. Vet Clin North Am Small Anim Pract. 1990; 20: 919-38.
- Wellman Ml. Lymphoproliferative Disorders Of Large Granular Lymphocytes. In: Feldmann B, Zinkl Jg, Jain N (Hrsg.): Schalm's Veterinary Hematology. 5. Aufl. Baltimore, Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2000. 642-7.
- Willard Md. Alimentary Biopsies: Pitfalls, Mistakes And Fallacies. Proc Acvim Denver 2001; 19: 541-3.
- Willard Md, Leid Rw. Nonuniform Horizontal And Vertical Distributions Of Immunoglobulin A Cells In Canine Intestines. Am J Vet Res. 1981; 42: 1573-80.
- Willard Md, Williams Jf, Stowe Hd, Kutil C. Number And Distribution Of Igm Cells And Iga Cells In Colonic Tissue Of Conditioned Sex- And Breed-Matched Dogs. Am J Vet Res. 1982; 43: 688-92.
- Willard Md, Lovering Sl, Cohen Nd, Weeks Br. Quality Of Tissue Specimens Obtained Endoscopically From The Duodenum Of Dogs And Cats. J Am Vet Med Assoc. 2001; 219: 474-9.
- Williams D. Small Intestinal Bacterial Overgrowth. Proc 19 Th Acvim Denver 2001; 544-6.
- Zentek J, Meyer H. Normal Handling Of Diets--Are All Dogs Created Equal? J Small Anim Pract. 1995; 36: 354-9.
- Zentek J, Marquart B, Pietrzak T, Balleve O, Rochat F. Dietary Effects On Bifidobacteria And Clostridium Perfringens In The Canine Intestinal Tract. J Anim Physiol Anim Nutr (Berl). 2003; 87: 397-407.

Zinkl Jg. Criteria Of Malignancy In Cytologic Preparations. California Veterinarian. 1981; 35: 13-7.

## ANHANG

### Rassen-, Alters- und Geschlechtsverteilung der einzelnen Gruppen

Tab. 16: Gruppe (1): junge Hunde (bis zu 24 Monate)

Patientennummer	Rasse	Geschlecht	Alter (Monate)
Patient 1	Mischling	Weiblich	10
Patient 2	Mischling	Weiblich	8
Patient 3	Deutscher Schäferhund	Männlich	22
Patient 4	Mischling	Weiblich	6
Patient 5	Mischling	Männlich	21
Patient 6	Dobermann	Weiblich	22
Patient 7	Labrador	Männlich	22
Patient 8	Mischling	Männlich	16
Patient 9	Rottweiler	Weiblich	11

männlich: 4; weiblich: 5; Ø Alter: 15, 3 Monate

Eingriffe: 3 x Rüdenkastration , 3 x Ovariohysterektomie, 1 x Zahnfraktur, 1 x nichtinfizierte Nahtdehiszenz (Re-OP), 1 x Implantatentfernung

Tab. 17: Gruppe (2): mittelalte Hunde (von 2 bis 8 Jahre)

Patientennummer	Rasse	Geschlecht	Alter (Jahre)
Patient 10	Pudel	Männlich	6,5
Patient 11	Labrador Retriever	Weiblich	2,25
Patient 12	Springer Spaniel	Männlich	5
Patient 13	Dobermann	Weiblich	3,5
Patient 14	Staffordshire Bullterrier	Männlich	6,25
Patient 15	Briard	Männlich	5
Patient 16	Bullterrier	Männlich	3,25
Patient 17	Staffordshire-Mischling	Weiblich	7
Patinet 18	Mischling	Weiblich	4

männlich: 5; weiblich: 4; Ø Alter: 4,75 Jahre

Eingriffe: 4 x Zahnfraktur, 2 x Ovariohysterektomie, 1 x OP an einem Nickhautdrüsenprolaps, 1 x Implantatentfernung, 1 x Zahnsteinentfernung

Tab. 18: Gruppe (3): Alte Hunde (älter als 8 Jahre)

<b>Patientennummer</b>	<b>Rasse</b>	<b>Geschlecht</b>	<b>Alter (Jahre)</b>
<b>Patient 19</b>	WHW-Terrier	Männlich	9
<b>Patient 20</b>	Bullterrier	Männlich	8,25
<b>Patient 21</b>	Langhaar-Dackel	Männlich	14,25
<b>Patient 22</b>	Mischling	Männlich	11
<b>Patient 23</b>	WHW-Terrier	Männlich	8,5
<b>Patient 24</b>	Mischling	Weiblich	8,5
<b>Patient 25</b>	Mischling	Männlich	8,5
<b>Patient 26</b>	Fox Terrier	Weiblich	8

männlich: 6; weiblich: 2; Ø Alter: 9,5 Jahre

Eingriffe: 5 x Zahnsteinentfernung, 2 x Ovariohysterektomie, 1 x Rüdenkastration



Tab. 19: Übersicht der Mittelwerte der allgemeinen Kriterien

Pat	Ag	Qual	Mono	fKP	Zell	Kont	Bak	Par	Ing	PE
1	1	1	2	2	2	1	1	0	1	1
2	1	1	2	3	2	1	0	0	2	0
3	1	2	3	2	2	1	0	0	1	0
4	1	2	2	2	2	1	0	0	1	0
5	1	2	3	1	2	1	0	0	1	0
6	1	2	3	1	2	1	0	0	1	0
7	1	2	3	1	2	1	0	0	1	0
8	1	1	1	3	2	2	0	0	2	0
9	1	2	3	2	2	1	0	0	1	0
10	2	1	2	2	2	1	0	0	1	0
11	2	1	2	3	2	1	0	0	2	1
12	2	2	3	2	2	1	0	0	1	1
13	2	2	3	2	2	1	1	0	1	0
14	2	2	2	3	2	1	0	0	2	0
15	2	1	1	2	1	2	0	0	2	1
16	2	2	3	1	2	2	0	0	1	0
17	2	2	3	1	2	1	0	0	1	0
18	2	2	3	1	2	1	0	0	1	0
19	3	1	2	2	1	1	0	0	2	1
20	3	2	3	2	2	1	0	0	1	0
21	3	1	2	2	2	1	0	0	1	0
22	3	2	2	2	2	1	0	0	1	1
23	3	2	3	2	2	1	0	0	2	0
24	3	2	3	2	2	1	0	0	1	1
25	3	2	3	2	2	2	0	0	1	0
26	3	2	3	1	2	1	0	0	1	0

Pat = Patientennummer, Ag = Altersgruppe, Qual = Qualität, Mono = Monolayer, fKP = freies Kernprotein, Zell = Zellularität, Kont = Kontamination, Bak = Bakterien, Par = Parasiten, Ing = Ingesta/Debris, PE = Plattenepithelien

Tab. 20: Übersicht der Mittelwerte der Zellpopulationen - Absolutangabe

Pat	Ag	kdL	khL	mhL	ghL	ggL	Neu	Eos
1	1	15,25	3,5	15,75	2,5	5,75	0,25	0
2	1	32,75	50,5	71,5	8,5	5	0	6,25
3	1	34,75	15	61	8,75	0	0	0,25
4	1	48	10,25	56,5	7,5	2,5	0	0,25
5	1	37	10	36	5,25	0,25	0	0,5
6	1	48,25	12,25	72,5	10	2	0	0
7	1	62,5	12,25	89,25	3	0,5	0	0,5
8	1	82	40,25	108,5	7,25	1	0	2,25
9	1	32,75	8,25	43,5	2,75	4	0,5	1,75
10	2	52,5	8,25	40	0,5	0	0,5	0
11	2	10	5	26,67	0	3,33	0	0
12	2	40,25	13,75	65,5	1,75	0,25	0	0,25
13	2	29,5	4,5	41	0,75	0	0	0
14	2	1,5	77,25	19,5	7	0,5	0	0
15	2	96,5	29,5	54,5	7	0	0	0
16	2	66,25	18	75,25	4,25	0	0	0
17	2	72,25	13,5	55,5	7	0,5	0	2,75
18	2	27,5	1,75	22,25	2,5	0,25	0,5	0
19	3	1	46,67	1	0	0	0	0,33
20	3	78	71	33,25	5,5		3,25	0,5
21	3	21,5	24,25	43,5	5,75	0,25	0	0
22	3	146,25	40	149,25	5,5	0	0	0,5
23	3	46	7,75	31,75	2,75	0,25	0	1
24	3	63,25	8,75	47,25	1,75	0,25	0,25	0,75
25	3	99	38,5	82	5,75	2,5	3	7,5
26	3	52	7,25	19,25	2	2	2,5	0

Pat = Patientennummer, Ag = Altersgruppe, kdL = kleine dunkle Lymphozyten, khL = kleine helle Lymphozyten, mhL = mittelgroße helle Lymphozyten, ghL = große helle Lymphozyten, ggL = große granulierte Lymphozyten, Neu = neutrophile Granulozyten, Eos = eosinophile Granulozyten,

Fortsetzung Tab. 20: Übersicht der Mittelwerte der Zellpopulationen - Absolutangabe

<b>Pat</b>	<b>Ag</b>	<b>Pla</b>	<b>Ma</b>	<b>Ent</b>	<b>sEnt</b>	<b>Total</b>
1	1	0	0,25	1846,75	15	1904,25
2	1	1,25	1,5	1446,25	7,25	1630
3	1	0,5	0	1628,75	15	1764
4	1	0	0,75	1771	6,25	1903
5	1	0,5	1,5	2135,75	39	2265,75
6	1	0	1,25	2328,5	53,5	2528,25
7	1	0	1	2281,75	8,5	2459,25
8	1	0,5	1	2006,5	5,75	2255
9	1	0	0,25	2296,5	3,25	2393,5
10	2	0	0	1612,75	8,25	1722,75
11	2	0	0,33	1450,67	11,67	1507,67
12	2	0,75	0,25	1534,75	15,75	1673,25
13	2	0	0	1736,25	9	1821
14	2	0,25	1	2102,5	9,5	2219
15	2	0	0	2280,5	37	2505
16	2	0,5	1,75	2413	35	2614
17	2	0	0,25	2532	30,25	2714
18	2	0	0	1848,75	4,25	1907,75
19	3	0	0,33	1350	4,67	1404
20	3	0,75	0,75	2140	49	2382,75
21	3	0	0,25	2175	3,5	2274
22	3	0,25	0	1720,5	15,25	2077,5
23	3	1,25	0,25	1702,75	16,5	1811
24	3	0	0	1727,5	14	1863,75
25	3	2,25	1	2719,50	48,5	3009,5
26	3	0,25	0,75	2360,75	34,5	2482

Pat = Patientennummer, Ag = Altersgruppe, Pla = Plasmazellen, Ma = Mastzellen, Ent = Enterozyten, sEnt = sezernierende Enterozyten, Total = Gesamtzellzahl

Tab. 21: Übersicht der Mittelwerte der Zellpopulationen – Prozentangabe

Pat	Ag	kdL%	khL%	mhL%	ghL%	ggL%	Neu%
1	1	0,81	0,17	0,82	0,13	0,3	0
2	1	2,05	3,72	4,44	0,55	0,33	0
3	1	1,99	0,85	3,43	0,48	0	0
4	1	2,44	0,5	2,84	0,4	0,08	0
5	1	1,71	0,45	1,65	0,23	0,01	0
6	1	1,91	0,47	2,83	0,39	0,07	0
7	1	2,51	0,47	3,55	0,12	0,02	0
8	1	3,61	1,74	4,76	0,32	0,05	0
9	1	1,34	0,34	1,85	0,11	0,35	0,02
10	2	3,11	0,5	2,34	0	0	0,03
11	2	0,65	0,32	1,75	0	0,22	0
12	2	2,46	0,81	3,93	0,09	0,01	0
13	2	1,6	0,24	2,24	0,04	0	0
14	2	0,06	3,5	0,84	0,28	0,03	0
15	2	3,86	1,17	2,16	0,28	0	0
16	2	2,35	0,59	2,62	0,18	0	0
17	2	2,59	0,52	2,09	0,26	0,02	0
18	2	1,44	0,09	1,17	0,14	0,01	0,03
19	3	0,09	3,36	0,08	0	0	0
20	3	3,36	2,99	1,35	0,23	0	0,14
21	3	0,97	1,11	1,99	0,23	0,01	0
22	3	6,91	1,9	7,18	0,27	0	0
23	3	2,53	0,43	1,78	0,15	0,01	0
24	3	3,34	0,46	2,47	0,1	0,01	0,02
25	3	3,23	1,26	2,69	0,19	0,09	0,11
26	3	2,18	0,3	0,8	0,08	0,08	0,11

Pat = Patientennummer, Ag = Altersgruppe, kdL = kleine dunkle Lymphozyten, khL = kleine helle Lymphozyten, mhL = mittelgroße helle Lymphozyten, ghL = große helle Lymphozyten, ggL = große granulierte Lymphozyten, Neu = neutrophile Granulozyten

Tab. 21: Übersicht der Mittelwerte der Zellpopulationen – Prozentangabe

<b>Pat</b>	<b>Ag</b>	<b>Eos%</b>	<b>Pla%</b>	<b>Ma%</b>	<b>Ent%</b>	<b>sEnt%</b>
1	1	0	0	0	97,01	0,77
2	1	0,49	0,1	0,11	87,83	0,44
3	1	0,01	0,03	0	92,35	0,78
4	1	0,01	0	0,05	93,3	0,34
5	1	0,02	0,02	0,07	94,15	1,69
6	1	0	0	0,05	92,17	2,1
7	1	0,02	0	0,04	92,89	0,87
8	1	0,1	0,02	0,04	89,08	0,28
9	1	0,07	0	0,01	95,94	0,15
10	2	0	0	0	93,56	0,16
11	2	0	0	0,02	96,26	0,78
12	2	0,01	0,05	0,01	91,63	0,97
13	2	0	0	0	95,39	0,49
14	2	0	0,01	0,04	94,78	0,45
15	2	0	0	0	91,05	1,49
16	2	0	0,02	0,07	93	1,17
17	2	0,1	0	0,01	93,6	1,11
18	2	0	0	0	96,91	0,22
19	3	0,02	0	0,02	96,02	0,43
20	3	0,02	0,03	0,03	89,79	2,01
21	3	0	0	0,01	95,55	0,13
22	3	0,02	0,01	0	85,44	0,75
23	3	0,06	0,07	0,01	94,04	0,87
24	3	0,04	0	0	92,82	0,77
25	3	0,26	0,07	0,04	90,46	1,59
26	3	0	0,01	0,03	95,03	1,34

Pat = Patientennummer, Ag = Altersgruppe, Eos = eosinophile Granulozyten, Pla = Plasmazellen, Ma = Mastzellen, Ent = Enterozyten, sEnt = sezernierende Enterozyten

Tab. 22: Übersicht der Mittelwerte der Kernkriterien

Pat	Ag	Mit	K/Z	Chro	Kme	Kfa	Nuc	N/K	FaN	FoN	Zgr	FZy	VZy
1	1	0	1	2	1	4	1	2	4	2	0	2	0
2	1	0	1	1	1	4	0	1	4	2	0	2	1
3	1	0	1	2	1	4	1	2	4	2	0	2	0
4	1	0	1	1	1	4	1	1	4	2	0	2	1
5	1	0	1	1	1	4	1	1	4	1	0	2	1
6	1	0	1	1	1	3	1	1	4	1	0	2	1
7	1	0	1	2	1	4	2	2	4	1	0	2	1
8	1	0	1	2	1	4	1	2	4	1	0	2	1
9	1	0	1	2	1	4	1	2	4	1	0	2	1
10	2	0	1	1	1	3	1	1	4	1	0	2	1
11	2	0	1	1	0	4	0	1	4	1	0	2	1
12	2	0	1	2	2	4	1	2	4	2	0	2	1
13	2	0	1	2	2	3	1	2	4	2	0	2	1
14	2	0	1	1	2	4	0	2	4	1	0	2	1
15	2	0	1	1	1	4	0	1	4	1	0	2	1
16	2	0	1	2	1	4	2	2	3	1	0	2	1
17	2	0	1	2	1	4	1	1	4	1	0	2	1
18	2	0	1	2	1	4	1	1	4	1	0	2	1
19	3	0	1	1	1	4	0	1	4	1	0	2	1
20	3	0	1	1	1	4	0	1	4	2	0	2	1
21	3	0	1	2	1	4	1	2	4	1	0	2	1
22	3	0	1	2	1	4	1	1	4	1	0	2	1
23	3	0	1	2	1	4	1	1	4	1	0	2	1
24	3	0	1	2	1	4	1	1	4	1	0	2	1
25	3	0	1	1	1	4	0	0	4	1	0	2	1
26	3	0	1	1	1	4	1	1	4	1	0	2	1

Pat = Patientennummer, Ag = Altersgruppe, Mit = Mitosen, K/Z = Kerne pro Zelle, Chro = Chromatinstruktur, Kme = Kernmembranverdickungen, Kfa = Kernfarbe, Nuc = Deutlichkeit der Kernkörperchen, N/K = Kernkörperchen pro Zelle, FaN = Farbe der Kernkörperchen, FoN = Form der Kernkörperchen, Zgr = Zellgrenzen, FZy = Farbe des Zytoplasmas, VZy = Vakuolen im Zytoplasma

Tab. 23: Übersicht der hämatologischen Untersuchung - Blutbild

Pat	Ag	Ery ( $\times 10^{12}/l$ )	Hb (mmol/l)	Hkt (l/l)	Thro ( $\times 10^9/l$ )	Leu ( $\times 10^9/l$ )
1	1	5,6	8,3	0,37	276	12,2
2	1	6,3	9,3	0,43	344	10,8
3	1	6,2	9,6	0,42	231	8,1
4	1	6,3	9,3	0,44	522	11,1
5	1	7,3	10,3	0,53	233	9,8
6	1	7,4	9,9	0,48	395	5,9
7	1	6,6	9,9	0,47	470	10,7
8	1	7,2	9,9	0,46	413	18,6
9	1	6,3	8,9	0,42	644	17,7
10	2	5,8	8,9	0,42	290	6,8
11	2	5,5	8,5	0,38	267	6,1
12	2	7,6	11,3	0,54	336	8,3
13	2	6,8	10,1	0,45	472	7,8
14	2	5,6	8,7	0,42	533	10,9
15	2	7,5	10,8	0,51	302	8,7
16	2	6,8	10,4	0,50	267	11,1
17	2	6,6	10,2	0,47	401	8,9
18	2	7,1	11,6	0,54	721	8,8
19	3	6,8	10,3	0,49	475	8,8
20	3	7,8	10,7	0,51	399	11,5
21	3	6,3	9,0	0,43	440	7,2
22	3	6,9	10,5	0,50	486	8,5
23	3	6,9	10,3	0,48	407	12
24	3	4,7	6,9	0,31	551	6,3
25	3	6,0	9,0	0,43	432	6,8
26	3	5,8	8,6	0,41	538	5,4

Pat = Patientennummer; Ag = Altersgruppe; Ery = Erythrozyten; Hb = Hämoglobin;  
Hkt = Hämatokrit; Thro = Thrombozyten; Leu = Leukozyten

Tab. 24:Übersicht der hämatologischen Untersuchung - manuelle Differenzierung

Pat	Ag	Eos (%)	juN (%)	staN (%)	seN (%)	Lym (%)	aLy (%)	Mo (%)
1	1	5	0	1	67	17	0	10
2	1	15	0	1	58	17	0	9
3	1	6	0	1	71	14	0	8
4	1	6	0	0	69	20	0	5
5	1	11	0	1	72	10	0	6
6	1	14	0	3	54	22	0	7
7	1	6	0	0	54	38	0	2
8	1	24	0	0	37	31	6	2
9	1	8	0	0	70	14	0	8
10	2	4	0	0	63	28	0	5
11	2	11	0	1	55	26	0	5
12	2	2	0	0	82	12	0	4
13	2	14	0	0	64	15	0	7
14	2	5	0	0	77	13	0	5
15	2	0	0	1	82	15	0	2
16	2	6	0	0	67	19	0	8
17	2	10	0	1	73	11	0	5
18	2	6	0	0	81	10	0	3
19	3	5	0	1	68	23	0	3
20	3	2	0	0	81	13	0	4
21	3	0	0	0	86	9	0	5
22	3	4	0	0	67	22	0	7
23	3	0	0	0	84	9	0	7
24	3	7	0	0	73	14	0	6
25	3	8	0	0	68	19	0	5
26	3	5	0	0	85	10	0	0

Pat = Patientennummer; Ag = Altersgruppe; Eos = eosinophile Granulozyten; juN = jugendliche neutrophile Granulozyten; staN = stabkernige neutrophile Granulozyten; seN = segmentkernige neutrophile Granulozyten; Lym = Lymphozyten; aLy = aktivierte Lymphozyten; Mo = Monozyten



## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. Gerhard Oechtering danke ich für die Überlassung des Themas, für die freundliche Aufnahme in der Klinik für Kleintiere und die stets gewährte Unterstützung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Christian Stockhaus für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung zu jeder Zeit, die fachliche Anleitung, die Manuskriptdurchsicht und die qualifizierte zytologische und internistische Ausbildung. Vor allem auch mit seinem freundschaftlichen Rat, seinen Anregungen und konstruktiven Kritiken hat er maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Gedankt sei Herrn Dr. Erich Teske (Department of Clinical Sciences, University of Utrecht, The Netherlands) für die unkomplizierte Hilfe und Beratung bei der statistischen Auswertung.

Den Mitarbeiterinnen des Labors der Klinik für Kleintiere und besonders Frau W. Goette möchte ich herzlichst danken für die tatkräftige Unterstützung mit Weitblick bei der Laborarbeit, den vielen aufmunternden Worten zwischendurch und der großen Hilfsbereitschaft bei der Bewältigung alltäglicher Probleme.

Herrn Dr. Ingmar Kiefer und Frau Maren März möchte ich danken für die Hilfe bei meinen Computerproblemen.

Herrn Dr. Eberhard Ludewig danke ich für die kritische Durchsicht des Manuskriptes.

Ich danke allen Mitarbeitern der Klinik für Kleintiere der Universität Leipzig, die mich, jeder auf seine Weise, unterstützt haben.

Nicht vergessen möchte ich meine Freunde und meine Familie, insbesondere meine Eltern, für die freundschaftliche Hilfe und Aufmunterung während dieser Zeit, sowie jegliche Unterstützung, auf die ich mich jederzeit verlassen konnte.